

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年10月27日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/100560 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C07K 16/28, 16/46,
A61P 35/00, 37/02, 43/00, A61K 39/395

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 尾崎 修治 (OZAKI, Shuji) [JP/JP]; 〒7700804
徳島県徳島市中吉野町3丁目50-1 Tokushima (JP).
安倍 正博 (ABE, Masahiro) [JP/JP]; 〒7700033 徳島県
徳島市南佐吉3番町7-12 Tokushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005152

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2004年4月9日 (09.04.2004)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土屋 政幸
(TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御
殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
Shizuoka (JP). 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒
4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中
外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 川合 重人 (KAWAI,
Shigeto) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁
目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

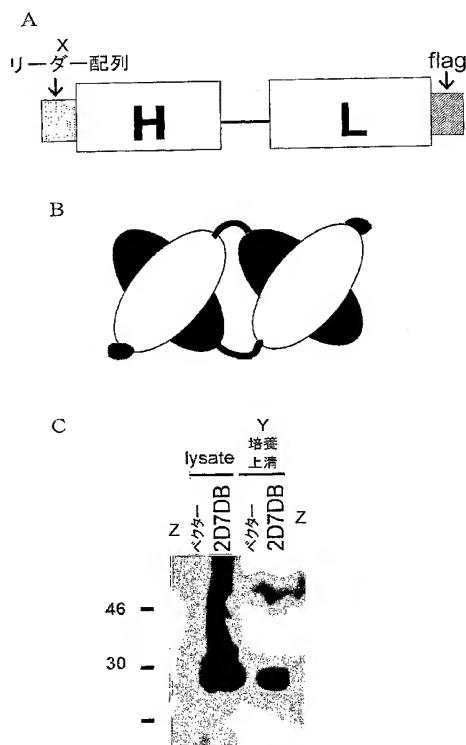
(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目
5番1号 Tokyo (JP).

/ 続葉有 /

(54) Title: CELL DEATH INDUCER

(54) 発明の名称: 細胞死誘導剤



X... LEADER SEQUENCE
Y... CULTURE SUPERNATANT
Z... VECTOR 2D7DB

(57) Abstract: Cloning of antigen 2D7 has been carried out to identify an antigen relevant to antibody 2D7. As a result, it has been found that the antibody 2D7 recognizes HLA class IA. Further, whether or not the antibody 2D7 has cell death inducing activity has been studied. As a result, it has been found that nuclear fragmentation is observed by crosslinking of the antibody 2D7 with another antibody to thereby bring about induction of cell death. Still further, it has been found that a diabody of antibody 2D7 exhibits very strong cell death inducing activity even when any other antibody is not added. These results suggest that an antibody with lowered molecular weight among antibodies capable of recognizing HLA can be utilized as a cell death inducer.

(57) 要約: 本発明者らは、2D7抗体の抗原を同定することを目的として、2D7抗原のクローニングを行った。その結果、2D7抗体がHLA class IAを認識することを見出した。また、2D7抗体が細胞死誘導活性を有するか否かを検討した。その結果、2D7抗体をさらに別の抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されることが分かった。さらに、2D7抗体のDiabodyは、さらに別の抗体を添加しなくても非常に強力な細胞死誘導活性を有することが判明した。以上の結果は、HLAを認識する抗体の低分子化抗体が細胞死誘導剤として利用できることを示している。

WO 2005/100560 A1



(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市御町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

細胞死誘導剤

5 技術分野

本発明は、HLA を認識する低分子化抗体に関する。

背景技術

HLA class I 抗原は、3つのドメイン ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$) からなる 45KD の α 鎮と、12KD の $\beta 2$ ミクログロブリンのヘテロダイマーによって形成される。HLA 分子の主な役割は、細胞の中で作られる 8~10 程度のアミノ酸でできた抗原ペプチドを $CD8^+T$ 細胞に提示することであり、これによって誘導される免疫応答や免疫寛容に非常に重要な役割を担っている。

また、HLA class IA 抗原の抗体によるライゲーションで、細胞増殖抑制や細胞死誘導効果がリンパ球細胞において観察されており、HLA 分子のシグナル伝達分子としての可能性も示唆されている。

すなわち、例えばヒト HLA class IA の $\alpha 1$ ドメインに対する抗体 B9.12.1、 $\alpha 2$ ドメインに対する抗体 W6/32、 $\alpha 3$ ドメインに対する抗体 TP25.99、A1.4 は、活性化リンパ球に対して細胞増殖を抑制するとの報告がある（非特許文献 1、2）。

また、 $\alpha 1$ ドメインに対する二種類の抗体 MoAb90、YTH862 は、活性化リンパ球に対してアポトーシスを誘導することが報告されている（非特許文献 2、3、4）。この 2 つの抗体によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼを介した反応であることが明らかにされており（非特許文献 4）、このことからリンパ細胞で発現する HLA class IA 抗原は、アポトーシスの信号伝達にも関与していると推測されている。

さらに、ヒト HLA class IA の $\alpha 3$ ドメインに対する抗体 5H7（非特許文献 5）、

- 2 -

マウス HLA class IA の α 2 ドメインに対する抗体 RE2 (非特許文献 6) も、活性化リンパ球などに細胞死を誘導することが報告されている。しかしながら前出のアポトーシス誘導抗体 MoAb90 や YTH862 とは違い、これらの抗体によって誘導される細胞死は、いずれもカスパーゼを介さないことが示されている。このことから、5H7 や RE2 による細胞死は、従来知られているアポトーシスの機構とはまったく異なるタイプの細胞死であると推測されている。

以上のように、抗 HLA 抗体による細胞増殖抑制、細胞死誘導作用に関する報告はこれまで複数なされている。ただし、ここで利用されている抗体の分子形態はいずれも IgG 抗体、もしくは F(ab')2、Fab であり、また F(ab')2 や Fab のように抗体を低分子化することで、細胞死誘導活性が上昇したとの知見は今のところない。

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

- [非特許文献 1] Fayen et al., Int. Immunol 10: 1347-1358 (1998)
- [非特許文献 2] Genestier et al., Blood 90: 3629-3639 (1997)
- 15 [非特許文献 3] Genestier et al., Blood 90: 726-735 (1997)
- [非特許文献 4] Genestier et al., J. Biol. Chem. 273: 5060-5066 (1998)
- [非特許文献 5] Woodle et al., J. Immunol. 158: 2156-2164 (1997)
- [非特許文献 6] Matsuoka et al., J. Exp. Med. 181: 2007-2015 (1995)
- [非特許文献 7] Goto, et al. Blood 84: 1922 (1994)

20

発明の開示

本発明の第一の目的は、HLA class IA を認識する抗体の低分子化抗体を提供することにある。本発明のさらなる目的は、この低分子化抗体を利用した新たな腫瘍または自己免疫疾患の治療剤を提供することにある。

25 本発明者らは、HLA class IA を認識する 2D7 抗体を取得した。その後、2D7 抗体が細胞死誘導活性を有するか否かを検討した。具体的には、Jurkat 細胞に 2D7

存在下あるいは非存在下で、さらに抗マウス IgG 抗体を加え培養を行い、48 時間後、細胞核を Hoechst33258 で染色し、死細胞に特徴的な細胞核の断片化が認められるか観察した。その結果、Jurkat 細胞において、2D7 抗体単独ではほとんど細胞死誘導活性が検出されなかったが、さらに抗マウス IgG 抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されることが分かった。

5 このように 2D7 抗体による細胞死誘導には抗マウス IgG 抗体によるクロスリンクが必要であるため、腫瘍または自己免疫疾患に対する 2D7 抗体の臨床応用は難しい。そこで、本発明者らは、細胞死誘導に対する 2D7 抗体の低分子化の効果を検討した。具体的には、ハイブリドーマより 2D7 抗体の可変領域をコードする遺 10 伝子をクローニングし、遺伝子改変技術により 2D7 抗体の Diabody 化を行い、細胞死誘導活性に対する効果を検討した。その結果、驚くべきことに、Diabody 化した 2D7 抗体は、抗マウス IgG 抗体によるクロスリンクを行わなくても、非常に短時間かつ低い用量で強力な細胞死誘導活性を示した。また、該 Diabody は、正常末梢血由来リンパ球や、付着細胞にはほとんど作用せず、各種ミエローマ細胞 15 や T 細胞白血病細胞株、活性化リンパ球に対してのみ特異的に細胞死を誘導した。以上の結果は、HLA を認識する抗体の低分子化抗体が細胞死誘導剤として利用できることを示している。

即ち、本発明は、以下の [1] ~ [14] を提供するものである。

[1] 配列番号：13、14、15 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、
20 2、3 を有する重鎖可変領域を含む低分子化抗体。

[2] [1] の低分子化抗体の重鎖 CDR アミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる重鎖 CDR を有する低分子化抗体であって、[1] に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

25 [3] 配列番号：16、17、18 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、
2、3 を有する軽鎖可変領域を含む低分子化抗体。

- 4 -

[4] [3] の低分子化抗体の軽鎖 CDR アミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR を有する低分子化抗体であって、[3] に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

5 [5] 配列番号：13、14、15 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する重鎖可変領域、及び配列番号：16、17、18 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む低分子化抗体。

10 [6] [5] の低分子化抗体の CDR アミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる CDR を有する低分子化抗体であって、[5] に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

[7] 低分子化抗体が Diabody である [1] ～ [6] のいずれかに記載の低分子化抗体。

15 [8] [1] ～ [7] のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。

[9] B 細胞または T 細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、[8] に記載の細胞死誘導剤。

20 [10] B 細胞または T 細胞が、活性化 B 細胞または活性化 T 細胞である、[9] に記載の細胞死誘導剤。

[11] [1] ～ [7] のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

[12] [1] ～ [7] のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

25 [13] 腫瘍が血液腫瘍である [12] に記載の抗腫瘍剤。

[14] [1] ～ [7] のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含

有する、自己免疫疾患治療剤。

本発明は、HLA を認識する低分子化抗体を提供する。本発明における低分子化抗体は、活性が上昇している点で有用である。ここで、活性とは、抗体が抗原に結合することにより生じる生物学的作用をいう。具体的な例としては、細胞死誘導作用、アポトーシス誘導作用、細胞増殖抑制作用、細胞分化抑制作用、細胞分裂抑制作用、細胞増殖誘導作用、細胞分化誘導作用、細胞分裂誘導作用、細胞周期調節作用などを挙げることができるが、好ましくは細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用である。

細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用などの上記作用の対象となる細胞は特に限定されないが、血球系細胞や浮遊細胞が好ましい。血球系細胞の具体的な例としては、リンパ球（B 細胞、T 細胞）、好中球、好酸球、好塩基球、単球（好ましくは活性化した末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell、PBMC））、ミエローマ細胞などを挙げることができるが、リンパ球（B 細胞、T 細胞）、ミエローマ細胞が好ましく、T 細胞または B 細胞（特に活性化した B 細胞または活性化した T 細胞）が最も好ましい。浮遊細胞は、細胞を培養した際、細胞がガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着することなく、浮遊状で増殖する細胞である。これに対し、接着細胞（付着細胞）とは、細胞を培養した際、ガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着する細胞である。

本発明においては、上記 HLA を認識する低分子化抗体を投与することにより、
20 例えば、血液腫瘍（造血器腫瘍）などの腫瘍（具体的な例として、白血病、骨髓異形成症候群、悪性リンパ腫、慢性骨髓性白血病、形質細胞異常症（骨髓腫、多発性骨髓腫、マクログロブリン血症）、骨髓増殖性疾患（真性赤血球增加症、本態性血小板血症、特発性骨髓纖維症）など）や自己免疫疾患（具体的な例として、リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脳脊

髓炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体性ブドウ膜炎、乾癬、ベーチェット病など) のような疾患の治療、予防などをおこなうことが可能である。

5 本発明において、HLA とは、ヒト白血球抗原を意味する。HLA 分子は class I と class II に分類され、class I としては HLA-A、B、C、E、F、G、H、J などが知られており、class II としては HLA-DR、DQ、DP などが知られている。本発明の抗体が認識する抗原は HLA 分子であれば特に制限されないが、好ましくは class I に分類される分子であり、より好ましくは HLA-A である。

10 本発明において低分子化抗体とは、全長抗体(whole antibody、例えば whole IgG 等) の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域 (VH) 又は軽鎖可変領域 (VL) を含んでいることが好ましく、特に好ましいのは VH と VL の両方を含む断片である。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv (シングルチェイン Fv)、などを挙げることができるが、好ましくは scFv (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883、Pluckthun 「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」 Vol. 113, Resenburg 及び Moore 編, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)) である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E.

15

20

25

and Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137 参照)。

本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

5 本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体の VH を 2 つ以上及び VL を 2 つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非共有結合の両方でもよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VH と VL が非共有結合により結合して形成される VH-VL 対を 2 つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中的一方の VH-VL 対と他方の VH-VL 対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。

10

本発明において特に好ましい低分子化抗体は Diabody である。Diabody は、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント (例えば、scFv 等) (以下、Diabody を構成するフラグメント) を 2 つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2 つの VL と 2 つの VH を含む (P. Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097 号、W093/11161 号、Johnson et al., *Method in Enzymology*, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., *Protein Engineering*, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., *Structure*, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., *Protein Engineering*, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., *Mol. Immunol.* 33, 1301-1312, (1996))。Diabody を構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でもよいが、好ましくは非共有結合である。

15

また、Diabody を構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖 Diabody (scDiabody) とすることも可能である。その際、Diabody を構成する 20 フラグメント同士を 20 アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合すると、同一鎖上に存在する Diabody を構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、

二量体を形成する。

Diabody を構成するフラグメントは、 VL と VH を結合したもの、 VL と VL を結合したもの、 VH と VH を結合したもの等を挙げることができるが、好ましくは VH と VL を結合したものである。 Diabody を構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常 2~14 アミノ酸、好ましくは 3~9 アミノ酸、特に好ましくは 4~6 アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされる VL と VH とは、その間のリンカーガ短いため、同一鎖上の VL と VH の間で非共有結合がおこらず、単鎖 V 領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、 Diabody 作製と同じ原理で、 Diabody を構成するフラグメントを 3 つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

本発明の HLA-A を認識する低分子化抗体としては、配列番号： 13 、 14 、 15 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1 、 2 、 3 を有する重鎖可変領域を含む低分子化抗体、及び上記低分子化抗体の重鎖 CDR アミノ酸配列において、 1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる重鎖 CDR を有する低分子化抗体であって、上記低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体を挙げることができる。

又、配列番号： 16 、 17 、 18 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1 、 2 、 3 を有する軽鎖可変領域を含む低分子化抗体、及び上記低分子化抗体の軽鎖 CDR アミノ酸配列において、 1 もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR を有する低分子化抗体であって、上記低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体を挙げることができる。

- 9 -

本発明の低分子化抗体の好ましい例として、配列番号：13、14、15に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、及び配列番号：16、17、18に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む低分子化抗体を挙げることができる。

5 さらに、上記低分子化抗体のCDRアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるCDRを有する低分子化抗体であって、上記低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体を挙げることができる。

本発明の特に好ましい低分子化抗体としては、重鎖CDR1としてAspTyrPheI
10 1eHis（配列番号：13）のアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2としてTrpIlePhe
ProGlyAspAspThrThrAspTyrAsnGluLysPheArgGly（配列番号：14）のアミノ酸配
列を有し、重鎖CDR3としてSerAspAspPheAspTyr（配列番号：15）のアミノ
酸配列を有し、軽鎖CDR1としてSerAlaSerSerValSerTyrMetHis（配列番
号：16）のアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2としてSerThrSerAsnLeuAlaSer
15 （配列番号：17）のアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR3としてGlnGlnArgThrSe
rTyrProProThr（配列番号：18）のアミノ酸配列を有するDiabodyを挙げること
ができる。

ここで「機能的に同等」とは、対象となる低分子化抗体が、対象となるDiabod
yと同等の活性（例えば、HLA-Aへの結合活性、細胞死誘導活性など）を有するこ
20 とを意味する。

変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好
ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3
アミノ酸以内）であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ
酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例え
25 ばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、
親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミ

- 10 -

ノ酸 (G、A、V、L、I、P) 、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y) 、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M) 、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q) 、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H) 、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5 662-5666 、 Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 64 10 87-6500 、 Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433 、 Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。また、抗体の定常領域などのアミノ酸配列は当業者に公知である。

本発明において HLA を認識する低分子化抗体は、HLA に特異的に結合し、生物学的作用を有していれば特に制限されない。本発明の低分子化抗体は、当業者に公知の方法により作製することが可能である。例えば、実施例に記載されているように、HLA を認識する抗体の配列 (特に可変領域の配列や相補鎖決定領域 (CD R) の配列) を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。

HLA を認識する抗体の配列、特にフレームワーク領域 (F R) の配列は、既に公知の抗体の配列を用いることが可能であり、又、HLA を抗原として、当業者に公知の方法により抗 HLA 抗体を作製し、その抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば、以下のようにして行うことができる。HLA タンパク質若しくはその断片を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞 (ハイブリドーマ) をスクリーニングする。抗原の調製は公知の方法、例えばバ

- 1 1 -

キュロウイルスを用いた方法 (W098/46777 など) 等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイブリドーマの mRNA から逆転写酵素を用いて抗体の可変領域 (V 領域) の cDNA を合成し、得られた cDNA の配列を公知の方法により解読すればよい。

HLA を認識する抗体は、HLA と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト化 (Humanized) 抗体なども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体の可変領域をコードする DNA をヒト抗体の定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region ; FR) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体定常領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 W

- 1 2 -

0 96/02576 参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (19 5 93) 53, 851-856)。

これらキメラ抗体やヒト化抗体などについては、低分子化した後にキメラ化やヒト化等を行ってもよいし、キメラ化やヒト化等を行った後に低分子化を行ってもよい。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* 10 で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平 1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号 WO 93/12227, WO 15 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原 20 に結合する scFv の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 9 5/01438, WO 95/15388 を参考にすることができる。

従って、本発明の低分子化抗体を当業者に公知の方法でキメラ化、ヒト化などをすることも可能であり、このようなキメラ抗体、ヒト化等された抗体も本発明

の低分子化抗体に含まれる。

本発明の抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、
5 抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

本発明は、本発明の抗体をコードする DNA を包含する。又、該 DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、抗原への結合能及び活性を有する抗体をコードする DNA を包含する。ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9. 47-9. 58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) は当業者に公知であり、ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジエントな条件が挙げられる。低ストリンジエントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば 42°C、0.1×SSC、0.1%SDS の条件で
10 あり、好ましくは 50°C、0.1×SSC、0.1%SDS の条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジエントな条件が挙げられる。高ストリンジエントな条件とは、例えば 65°C、5×SSC 及び 0.1%SDS の条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同意を有する DNA が効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシー
15 に影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

本発明の DNA は、本発明の抗体の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明の DNA は、本発明
25 の抗体をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNA から合成された cDNA であるか、ゲノム DNA であるか、化学合成 DNA であるかなどを問わな

- 1 4 -

い。また、本発明の抗体をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。

本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体の DNA を発現ベクターへ組み込む。その際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 などが挙げられる。

本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター (Ward ら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、araB プロモーター (Better ら, Science (1988) 240, 1041-1043) 、または T7 プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (Pharmacia 社製) 、「QIAexpress system」 (QIAGEN 社製) 、pEGFP、または pET (この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい) などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (19

87) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3 (Invitrogen 社製) や、

5 pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL 社製））、植物由来の発現ベクター（例えば pMH1、pMH 2）、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター 10 （例えば、「Pichia Expression Kit」（Invitrogen 社製））、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター (Mulligan ら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTR プロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushima ら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMV プロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418 など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 などが挙げられる。

20 さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DH FR 遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOI など）を導入し、メトトレキセート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて 25 SV40 の複製起点を持つベクター (pcD など) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピロ

ーマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター (例えば pAdex1cw) やレトロウイルスベクター (例えば pZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5. 61-5. 63)。生体内への投与は、*ex vivo* 法であっても、*in vivo* 法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための產生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための產生系は、*in vitro* および *in vivo* の產生系がある。*in vitro* の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dh

fr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、
5 カチオニックリボソーム DOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポーレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバコ (Nicotiana tabacum) 由來の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。
10 真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (Aspergil
lus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、
15 大腸菌 (*E. coli*) 、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in v
itro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IM
20 DM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40°C で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* でポリペプチドを產生させる系としては、例えば、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とする DNA を導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを產生させ、回収する。

本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とする DNA を、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に產生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が產生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから產生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の DNA を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的の DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、

精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

本発明において、抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

本発明において、本発明の抗体が浮遊細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、実施例と同様に Jurkat 細胞又は ARH77 細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。又、抗体が接着細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、実施例と同様に HeLa 細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。

また、本発明は、本発明の低分子化抗体または 2D7 抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤または細胞増殖抑制剤を提供する。本発明の低分子化抗体または 2D7 抗体の細胞死誘導活性は、活性化された T 細胞または B 細胞で特に効果

が大きいと考えられるので、癌などの腫瘍（特に血液腫瘍）や自己免疫疾患の治療や予防に特に有効であると考えられる。このように本発明は、本発明の低分子化抗体または2D7抗体を用いた、癌などの腫瘍（特に血液腫瘍）や自己免疫疾患の治療方法や予防方法も提供するものである。低分子化されていない2D7抗体を有効成分として用いる場合には、抗IgG抗体などでクロスリンクすることが好ましい。

上記抗体には各種試薬を結合してコンジュゲート抗体として使用することもできる。このような試薬としては、化学療法剤、放射性物質、トキシンなどを挙げることができる。このようなコンジュゲート抗体は公知の方法により作製することができる（US5057313、US5156840）。

上記薬剤は、直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状

- 2 1 -

担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリ

5 ウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレンギリコール、ポリエチレンギリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM) 、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝

10 液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法によ

15 り行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

20 本発明の薬剤の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投

25 与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、よ

- 2 2 -

り好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

5 図面の簡単な説明

図 1 は、pMX2 ベクターの作製に用いたアダプターを示す図である。太字部分は BstXI 認識配列を示している。

図 2 A および図 2 B は、2D7 抗原の細胞株における発現を示す図である。2D7 抗体で各種細胞を染色し、その発現を調べた。（実線：一次抗体なし、点線：2D7 10 抗体）

図 3 は、2D7 抗体による免疫沈降を示す写真である。NIH3T3, RPMI8226, U266 細胞を可溶化し、2D7 抗体、抗 BST-1 抗体（コントロール）、またはプロテイン G のみで免疫沈降を行い、銀染色で蛋白を検出した。RPMI8226, U266 で 2D7 抗体により特異的に沈降する約 12KD の分子（矢印）が検出された。このバンドを切り出 15 し、ペプチドシークエンスを行った結果、 β 2 ミクログロブリンであることが分かつた。

図 4 は、スクリーニングの流れを示す図である。プール分け、DNA の調製、ウイルスへのパッケージング、3T3 細胞への感染、FACS によるスクリーニングまでを一つのスパンとして行った（図 4 A）。四次スクリーニング終了までに約 20 クローンにまで絞った。五次スクリーニングでは、コロニー 64 個をそれぞれ 96 ウエルプレートに植菌し、縦の列、横の列でプールを作りスクリーニングを行った。その結果、12 個の候補クローンが絞れた（図 4 B）。

図 5 は、FACS によるスクリーニングの結果を示す図である。図 5 A は二次スクリーニングの結果を、図 5 B は三次スクリーニングの結果を、図 5 C は四次スクリーニングの結果を示している。各プールよりレトロウイルスを調製後 NIH3T3 に 25 感染させ 3 日後に 2D7 抗体で細胞を染色した。スクリーニングごとにプールのサ

- 2 3 -

イズを徐々に小さくすることでクローンを絞っていった。

図 6 は、FACS によるスクリーニングの結果を示す図である。図 6 A は五次スクリーニングの結果を、図 6 B は最終スクリーニングの結果を示している。五次スクリーニングの結果、3, 4, 6, 8 の列、E, F, G の列に陽性クローンが含まれていることが分かった。12 個の候補クローンをスクリーニングした結果、E の列では 6E が陽性クローンであることが分かった。この 6E の塩基配列を解析した結果 HLA classI A*6802 をコードしていた。

図 7 は、2D7 抗体添加による細胞への影響を示す図及び写真である。2D7 抗体 (10 μ g/ml) 添加後、48 時間後に生細胞数を測定した。2D7 抗体を加えても、細胞増殖にほとんど変化が見られなかった (図 7 A)。K562 細胞 (図 7 B)、Jurkat 細胞 (図 7 C)、RPMI8226 細胞 (図 7 D) をそれぞれ抗体添加 24 時間後に観察した。2D7 抗体は Jurkat に対して細胞凝集を誘導した。

図 8 は、2D7 抗体のクロスリンクによる細胞死誘導を示す写真である。Jurkat 細胞に 2D7 抗体、抗マウス IgG を各組み合わせで作用させ、48 時間後に細胞核を染色した。2D7 抗体と抗マウス IgG を同時に作用させることにより、細胞死による核の断片化が観察された。

図 9 は、2D7 Diabody (2D7DB) の配列を示す図である。図中の塩基配列を配列番号：3、アミノ酸配列を配列番号：4 に示す。

図 10 A および図 10 B は、2D7 Diabody の構造を示した図である。図 10 C は COS7 での一過性発現を示した写真である。

図 11 A および図 11 B は、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB の細胞傷害活性を示した図である。

図 12 は、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB の細胞傷害活性を示した図である。K562 細胞 (図 12 A)、Jurkat 細胞 (図 12 B) を用いて行った。

図 13 は、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB の細胞傷害活性を示した図である。RPMI8226 細胞 (図 13 A)、IL-KM3 細胞 (図 13 B)、U266 細胞 (図 13 C)、

- 2 4 -

ARH77 細胞（図 13 D）を用いて行った。

図 14 は、精製 2D7DB の増殖抑制効果を示したグラフである。

図 15 は、誘導 48 時間後における精製 2D7DB による細胞死誘導を示した図である。ARH77 細胞（図 15 A）、Jurkat 細胞（図 15 B）、K562 細胞（図 15 C）、
5 HeLa 細胞（図 15 D）を用いて行った。

図 16 は、誘導 48 時間後における精製 2D7DB による細胞死誘導を示した図である。U266 細胞（図 16 A）、IL-KM3 細胞（図 16 B）を用いて行った。

図 17 は、2D7DB (2 μ g/ml) による細胞死誘導のタイムコースを示した図である。12 時間から 38 時間における細胞死誘導を調べた。ARH77 細胞（図 17 A）、
10 Jurkat 細胞（図 17 B）を用いて行った。

図 18 は、2D7DB (2 μ g/ml) による細胞死誘導のタイムコースを示した図である。3 時間から 6 時間における細胞死誘導を調べた。ARH77 細胞（図 18 A）、Ju
rkat 細胞（図 18 B）を用いて行った。

図 19 は、2D7DB による細胞死に対する Z-VAD-FMK の効果を示した図である。A
15 RH77 細胞を用いて、誘導 16 時間後に行った。

図 20 は、2D7DB による細胞死に対する Z-VAD-FMK の効果を示した図である。Ju
rkat 細胞を用いて、誘導 16 時間後に行った。

図 21 は、2D7DB による細胞死が DNA の断片化に伴わないことを示した写真である。細胞死誘導 24 時間後に行った。

20 図 22 は、2D7DB の細胞死誘導活性に対するサイトカラシン D の影響を調べた結果を示す図である。ARH77 細胞をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D であ
らかじめ処理しておくことにより、2D7DB によって誘導される細胞死に対して抵抗性を示すようになった。

25 図 23 は、細胞内のアクチンと核の様子を、免疫染色によって調べた結果を示す写真である。ARH77 細胞を図中の条件下で反応させた後、抗アクチン抗体でアクチンを（赤）、Hoechst33258 で細胞核を（青）検出した。2D7DB 处理した細胞

- 2 5 -

はアクチンが消失していた。

図 2 4 は、 2D7 Diabody がヒト骨髄腫マウスモデルにおいて、 血清中のヒト IgG (hIgG) 濃度の上昇を抑制することを示した図である。データは平均+SEM で表す。Vehicle 投与群と 2D7 Diabody 投与群との間に、対応の無い t 検定において 5 有意差 (* : p < 0.05) が存在した。

図 2 5 は、 2D7 Diabody がヒト骨髄腫マウスモデルにおいて、 延命効果を有することを示した図である。Vehicle 投与群と 2D7 Diabody 投与群との間に、一般化 Wilcoxon 検定において有意差 (* : p < 0.05) が存在した。

図 2 6 は、 PBMC に対する 2D7DB の作用を解析した図である。マイトゲンには PH 10 A-M (図 2 6 A) 、 ConA (図 2 6 B) および SAC (図 2 6 C) を用いた。また、図 2 6 D はマイトゲン非存在下での結果を示し、図 2 6 E は陽性対照 (ARH77) での結果を示す。上から順に、 2D7DB 非添加、 3 時間添加、 24 時間添加での結果を示す。

15 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[1] 細胞株

ヒトミエローマ細胞株 (RPMI8226, K562, ARH77) 、ヒト T 細胞白血病細胞株 20 (Jurkat) 、 FDC-P1、 HCl-16、及び、 2D7 ハイブリドーマ細胞株 (徳島大学由来) は 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 倍地 (GIBCO BRL 社製) で、ヒトミエローマ細胞株 (IL-KM3、 U266) は同培地にそれぞれ 2 ng/ml IL-6 (R & D 社製) を添加した培地で、 Ba/F3 は同培地に 2 ng/ml IL-3 (R & D 社製) を添加した培地で培養した。また COS7, 293T, HeLa, NIH3T3 及び BOSC23 は 10%FCS を含む DMEM 倍地 (GIBCO BRL 社製) で、 CHO は α -MEM 倍地 (GIBCO BRL 社製) +5%FCS 25 または 10%FCS で培養した。

- 2 6 -

[2] pMX2 ベクターの作製

GFP 遺伝子をウイルス粒子中にパッケージングするレトロウイルスベクター pMX-GFP の GFP 遺伝子領域を EcoRI-SalI で切り出し除いた。この領域に、BstXI site を配列上に持つアダプター (図 1) (ABI DNA synthesizer で合成後、*in vitro* 5 でアニールさせ使用) を挿入し、pMX2 とした。

[3] cDNA ライブラリーの作製

RPMI8226 細胞より、Trisol (GIBCO BRL 社製) を用いて定法により Total RNA を精製した。さらに、この Total RNA 200 μ g から、 μ MACS mRNA Isolation kit (Miltenyi Biotec 社製) を用い添付されたマニュアル書に従って mRNA を精製した。

10 3.6 μ g の mRNA を鋳型にしてランダムヘキサマー (SuperScript Choice System for cDNA Synthesis; Invitrogen) を用いて cDNA を合成した後、BstXI アダプター (Invitrogen 社製) を両末端に連結した。この cDNA を、BstXI で切断した pMX2 ベクターに挿入し、ELECTRO MAX DH10B (GIBCO BRL 社製) にエレクトロポレーション法により導入した (2.5 KV, 200 Ω 、25 μ F)。その後、1 ml の SOC を加え 37°C で一時間インキュベートし、40% グリセロール/ LB+Amp 1 ml を加え、一部をタイターチェックに使用し、残りは-80°C に保存した。得られたライブラリーを、1 ウェルあたり 1000 クローンになるように 96 穴プレート 2 枚に 200 μ l/ウェル (7%DMSO/LB+Amp) で巻き込み、37°C で一晩培養した。このプレートの 4 ウェル分 (4000 クローン分) をアンピシリン入り LB 培地 (4 ml) 一本に植菌した。

20 これを一つのプールとし、残りのウェルについても同様の操作を行い、最終的にプレート一枚より 24 プールを作製した。各プールを 37°C で一晩培養後 DNA を調整し (QIAGEN 社製)、パッケージング細胞へのトランスフェクションに用いた。植菌に使用したプレートは二次スクリーニングで使用するまで-80°C に保存した。

[4] 抗体の精製

25 2D7 抗体は、徳島大から送付された腹水 0.5 ml を Protein A Hi Trap Affinity column (Amersham Pharmacia 社製) に吸着させたのち、IgG 画分を 0.1 M Sodium

- 27 -

m Citrate, pH3.0 で溶出し、回収した。これをセントリコン (YM-10; ミリポア) で濃縮したのち PBS にバッファー置換を行い、最終的にトータル 5.34 mg の抗体を得た。これらを分注して-20°C に保存した (濃度 0.89 μ g/ μ l)。

[5] FACS

5 付着細胞の場合は 1 mM EDTA/PBS で細胞をはがし、浮遊細胞の場合は遠心回収後 FACS Buffer (2.5%FCS, 0.02%NaN3/PBS) に懸濁し、2D7 抗体 (最終濃度 10 μ g/ml) を含む buffer (5%FCS/ PBS) 中に氷上で一時間おいた。FACS Buffer で洗浄後、FITC-抗マウス IgG (Immunotech 社製) 溶液中 (1:150, 50 μ l FACS Buffer) で、氷上で 30 分間反応させ、これを FACS Buffer で 2 回洗浄後、ELITE (COLTETR 社製) で解析を行った。

[6] レトロウイルス感染

(i) レトロウイルスパッケージング

レトロウイルスパッケージング細胞である BOSC23 細胞は、トランスフェクション前日に 6×10^5 cells/ウェル 2 ml で 6 ウェルプレートに撒いておいた。トランセフェクションは以下の手順で行った。各プール由来プラスミド DNA 1 μ g に対して FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche 社製) 3 μ l を混ぜ室温で 20 分置いた後、前日撒いておいた BOSC23 細胞の培地中に加えた。その後 37°C で 48 時間培養後培地を回収した。3000 回転で 5 分遠心し死細胞を除いた培養液をウイルス液として使用した。

20 (ii) ウイルス感染

前日 1×10^5 cells/ウェル 2ml で 6 ウェルプレートに撒いた NIH3T3 細胞を、ボリブレン (hexadimethrine bromide; sigma) 10 μ g/ml を添加したウイルス液 1 ml 中で 24 時間培養した。その後フレッシュな培地 1.5 ml を加えさらに 48 時間培養を行い、その後遺伝子発現を FACS により解析した。

25 [7] 免疫沈降

細胞を lysis buffer (0.5%Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl,

5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml aprotinin) で溶解したのち、遠心して不溶化蛋白を除き cell lysate とした。これに、2D7 抗体 1 μ g を加え 4°Cで 4 時間インキュベートし、引き続き magnetic protein G (BioMag 社製)を加えさらに 1 時間インキュベートした。その後免疫複合体を lysis buffer で 3 回 wash し SDS-PAGE を行った。このゲルを添付のマニュアルに従って銀染色（第一化学）した。一方ペプチドシークエンスするために、SDS-PAGE 後のゲルを ProBlott (Applied Biosystems 社製) に転写し、クマシーブルー染色液 (0. 1%coomassie blue R-250 in 40%MetOH/ 1%acetic acid) で一分間染色した。5 0% MetOH で数回洗浄した後目的のバンドを切り出し、1 ml DDW で 5 回洗浄した 10 後真空乾燥し、ペプチドシークエンサーにかけた。

[8] 2D7 抗体を用いた細胞増殖アッセイ

各細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^6 cells/ml で PMA (50 ng/ml; GIBCO BRL), PHA (10 μ l/ml; GIBCO BRL) 存在下または非存在下で撒いた。そこに 2D7 抗体 (10 μ g/ml) を添加または非添加後 48 時間培養した。培養後、細胞の形態変化を 15 顕微鏡下で観察した。WST-8 (生細胞数測定試薬 SF; ナカライトスク) を添加し、37°Cで 2 時間培養後、OD₄₅₀ を測定することで相対的な生細胞数を測定した。

[9] クロスリンクによる細胞死誘導

Jurkat 細胞を 8×10^5 cells/ウェルで 24 ウェルプレートに撒き、2D7 抗体存在下 (5 μ g/ml) または非存在下で、さらに抗マウス IgG (Fc) 抗体 (Cappel 社製)を 20 10 μ g/ml 添加した。48 時間後に細胞を回収し、PBS で洗浄後メタノールを 70% 濃度になるように加え、-20°Cで 15 分置いた。細胞を FACS Buffer で数回洗浄後、H oechst33258 を 10 μ g/ml 濃度で添加し室温で 30 分インキュベートした。再度 FACS Buffer で細胞を洗浄し、スライドグラスの上に細胞を滴下し蛍光顕微鏡で核の様子を観察した。

[1 0] 2D7 可変領域のクローニング

2D7 ハイブリドーマ (徳島大学より供与) より total RNA を Trizol を用いて定

- 2 9 -

法により精製した。この RNA 3 μg を鋳型にして、SMART RACE cDNA Amplification kit (CLONTECH 社製) を用い、添付のマニュアルに従って cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして heavy chain、light chain の可変領域を以下のプライマーを用いて PCR 法により増幅を行った。

5 heavy chain: 5' - CAGGGGCCAGTGGATAGACTGATG (配列番号: 7)

light chain: 5' - GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG (配列番号: 8)

増幅された各可変領域をコードする cDNA は pCR-TOPO vector (Invitrogen 社製) にサブクローニングし塩基配列 (配列番号: 1 および 2) を決定した。

[1 1] 2D7 Diabody 発現ベクターの作製

10 各可変領域 cDNA をサブクローニングしたプラスミドを鋳型にして Heavy chain、及び、Light chain の可変領域 (VH, VL) をそれぞれ以下のプライマーにより増幅した。

Heavy chain

2D7DB-H1: 5' -CCTGAATTCCACCATGCGATGGAGCTGGATCTTC (配列番号: 9)

15 2D7DB-H2: 5' -AATTGGCTACCGCCCTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCCT (配列番号: 10)

Light chain

2D7DB-L1: 5' -TCCTCAGGTGGAGGCGGTAGCCAAATTGTTCTCACCCAGTCGCCAGC (配列番号: 11)

20 2D7DB-L2: 5' -ATTGCGGCCGCTTATCACTTATCGTCGTACCTTGTAGTCTTTATCTCCAACTTGTC
CCCGAGCC (配列番号: 12)

これにより増幅した VH、VL の各 cDNA を一つのチューブに混合しさらに PCR 反応を行った。この PCR 産物を鋳型にして、今度は 2D7DB-H1、2D7DB-L2 をプライマーにして再度 PCR 反応を行い、VH と VL が 5 mer のリンカーをはさんで連結した cDNA (配列番号: 3) を合成した。この cDNA を EcoRI-NotI 切断し、動物細胞発現ベクター pCXND3 の EcoRI-NotI 間に挿入した。塩基配列を確認し 2D7 Diabody 発

現ベクターpCXND3-2D7DB の構築を終了した。

[1 2] COS7 細胞での一過性発現

pCXND3-2D7DB、あるいはコントロールとして空のベクター2 μ g に対してトラン
スフェクション試薬 (LT-1, MIRUS 社製) 6 μ l を添付のマニュアルに従って混合
5 し、無血清培地 (OPTI-MEM, GIBCO BRL) に培地交換した COS7 細胞 (前日に 1 \times 1
 0^5 cells/ウェルで 6 ウェルプレートに撒いたもの) に添加した。5 時間後に血清
200 μ l を添加し 2 日から 3 日間培養した。その後培地を回収し、遠心により死細
胞を除去した培養上清を細胞傷害活性の検出実験に用いた。

一方培養上清中の 2D7DB の発現はウエスタンプロットにより確認した。すなわ
10 ち、培養上清の一部に等量の 2XSDS-PAGE Sample buffer を加え、また細胞は lys
is buffer (0.5%Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA)
を加えて溶解したのち、遠心して不溶化蛋白を除き cell lysate を調整しこれに
等量の 2XSDS-PAGE Sample buffer を加えた。各サンプルを SDS-PAGE 後、PVDF 膜
に転写し、抗 FLAG 抗体で 2D7 Single chain の発現を検出した。

15 [1 3] 2D7 Diabody 產生発現細胞株の樹立

PvuI で切断し直鎖化した pCXND3-2D7DB 20 μ g を CHO 細胞 (DXB11 株) に以下の
ようにエレクトロポレーション法により導入した。

CHO 細胞を ice-cold PBS で 2 回洗浄した後 1 \times 10⁷ cells/ml になるように PBS
に懸濁した。これに 20 μ g の上記プラスミドを混合し、電気パルス (1.5 KV, 25
20 μ FD) を与えた。適当な割合で細胞を希釈し 10 cm dish に撒きこみ、終濃度 500
 μ g/ml G418 (GIBCO BRL 社製) 存在下で培養を行った。生育したコロニーを～30 ク
ローンほどピックアップし、それら培養上清中の Diabody の発現量をウエスタン
プロットにより調べた。最も発現の高かったクローンを 5 nM MTX を含む核酸フリ
ーの MEM α 培地に拡大後、これを高產生細胞株としてストックした。

25 [1 4] 2D7 Diabody の大量精製

T-125 フラスコでサブコンフルエントの 2D7DB 高產生 CHO 細胞株を Trypsin-EDT

- 3 1 -

A ではがした後ローラーボトル (MEM α without nucleotide + 5%FCS 250 ml) に移した。4 日後に培養液を除去し PBS で 2 回洗浄した。その後、無血清化するために CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO BRL 社製) 250 ml に置換し 3 日間培養を行った後培養上清を回収した。遠心によって死細胞を除去した後フィルターを通してこれを
5 精製に用いた。

Single chain Fv の精製は以下のとおり行った。まず、Anti-Flag M2 カラムに回収した培養上清を Apply し吸着させた。これを Buffer A (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.01%Tween 20) で wash した後、Buffer B (100 mM Glycine pH 3.5, 0.01%Tween 20) で Single chain Fv を溶出した。回収したサンプルは直ちに終濃度 25 mM になるように Tris-HCl pH8.0 で中和した。これをひき続き Superdex200HR (26/60) カラムによるゲルろ過精製に用いた。0.01%Tween 20 を含む PBS 中で Single chain Fv の dimer fraction を回収した。回収したサンプルの一部を SDS 電気泳動および銀染色を行い、目的の蛋白が精製されていることを確認した後これを濃縮し、2D7 Diabody 精製標品とした。
10
15

[15] 2D7 Diabody による細胞死誘導実験

各種血球系細胞株の場合は、 $2\sim5\times10^5$ cells/ウェルになるように 24 ウェルプレートに細胞を撒いた。これに、精製した 2D7DB を、あるいは 2D7DB を一過性に発現させた COS7 の培養上清を加え細胞死誘導を行った。2D7DB を一過性に発現させた COS7 培養上清を用いた場合はその培養上清の濃度が 50% になるように加えた。各ウェルとも培地の量は 0.8~1 ml/ウェルで行った。Jurkat 細胞に刺激を加える場合は、2D7DB の添加時に Con A (WAKO 社製) を終濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように同時に添加した。
20
25

付着細胞 (HeLa) の場合は、 2×10^5 cells/ウェルになるように 6 ウェルプレートに細胞を撒き一晩培養することで細胞を付着させた。その後培養液中に精製した 2D7DB を添加した。
2D7DB を添加し数時間から数日経った後、浮遊細胞はそのまま細胞を回収し、

- 3 2 -

付着細胞は 1 mM EDTA/PBS で細胞をはがして回収した後、ice-cold PBS で細胞を wash し、添付のマニュアルに従ってアポトシスマーカーである Annexin V、及び、死細胞マーカーである PI で細胞をラベルした (TACS AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit, Trevigen Instructions 社製)。その後、flow cytometry を 5 用いて染色された細胞の割合を測定した (EPICS ELITE, COULTER)。

[1 6] Actinomycin D による細胞死誘導

各種血球系細胞を $2\sim5\times10^5$ cells/ウェルになるように 24 ウェルプレートに撒いた。アポトシスの初期過程を阻害する目的でカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK, プロメガ) を終濃度 $50\mu M$ で添加し 2.5 時間インキュベートした後、細胞死誘導 10 を行った。Actinomycin D による細胞死誘導では Actinomycin D (sigma 社製) を $1\mu g/ml$ (Jurkat)、あるいは $5\mu g/ml$ (ARH77) 添加し、2D7DB による細胞死誘導 では精製 2D7DB を $2\mu g/ml$ になるように添加した。細胞死誘導から 16 時間後に細胞を回収し、Annexin V、PI で細胞を染色した。

[1 7] 2D7 Diabody を用いた細胞増殖アッセイ

15 各細胞を 96 ウェルプレートに $1\sim2\times10^4$ cells/ウェルの細胞濃度で撒いた。そこに 2D7DB を適当な濃度になるように添加し 3 日培養後細胞数の測定を行った。生細胞数の測定は、WST-8 を用いて行った。すなわち本試薬を $10\mu l$ /ウェルで細胞に添加し $37^\circ C$ で 1.5 時間培養後、分光光度計で OD_{450} を測定することで相対的な生細胞数を測定した。増殖抑制率は、 $(1 - (OD_{450} \text{ of } 2D7DB \text{ treated cells} / OD_{450} \text{ of } 2D7DB \text{ untreated cells})) \times 100$ により算出した。

[1 8] DNA の断片化の検出

ARH77、Jurkat 細胞を 2×10^6 cells/ウェルの細胞濃度になるように 6 ウェルプレートに撒き、それぞれのウェルに精製 2D7DB は終濃度 $2\mu g/ml$ で、Actinomycin D は終濃度 $1\mu g/ml$ (ARH77)、あるいは $5\mu g/ml$ (Jurkat) になるように添加する 25 ことで細胞死誘導を行った。また何も添加しない 1 ウェルをコントロールとした。24 時間培養後細胞を回収し PBS で細胞を一回洗浄し、lysis buffer (10 mM Tris

- 3 3 -

pH7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) で溶解した。引き続き遠心することで不溶性蛋白を除いた後、これを RNase A, Proteinase K 処理した。その後この一部をアガロースグルで電気泳動を行い、クロマチン DNA の断片化を検出した。

[19] サイトカラシンDによる細胞死誘導阻害

5 ARH77細胞を、 5×10^5 cells/ウェル細胞濃度になるように24ウェルプレートに播き、サイトカラシンD (sigma社製) を終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ になるように加えた。またエタノールのみを加えたウェルをコントロールとした。1時間培養後、精製した2D7DBを各濃度 (0, 200, 500, 1000ng/ml) で加え、さらに4時間培養を行った。その後細胞を回収し、PIで染色することで死細胞の割合を検出した。

10 [20] 2D7DB処理した細胞の抗アクチン抗体を用いた免疫染色

サイトカラシンD処理/未処理のARH77細胞に、2D7DBを $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度で加え、37°Cで15分培養した後、細胞をサイトスピンによりスライドグラス上に付着させた。-20°Cのメタノールに15分浸して細胞を固定した後、ブロッキングバッファー (3% BSA/PBS) で4°C 1時間ブロッキング処理を行った。その後、1% BSA/PBS中で100倍希釈したCY3標識抗アクチン抗体 (sigma社製) を室温で1時間反応させた後、引き続いてHoechst33258で細胞核を染色した。PBSで数回洗浄した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡(オリンパス)で細胞を観察した。

[実施例1] 各種細胞株における 2D7 抗原の発現解析

cDNA 発現ライブラリー作製のための source にすべき細胞株、および、宿主にすべき細胞株を決定するため、各種動物細胞における 2D7 抗原の発現を FACS により解析した (図 2 A および図 2 B)。その結果、ヒト由来血球系細胞ではリンパ性腫瘍細胞株 RPMI8226, U266, 及び、Jurkat で 2D7 抗原の非常に強い発現が観察されたが、K562 では発現が弱いことが分かった。マウス由来血球細胞である Ba/F 3, FDC-P1, HCI-16 では種の違いによるためか発現が非常に弱かつた。付着細胞では、COS7, 293T, HeLa においても発現が認められた。マウス NIH3T3 細胞では、ほとんど発現が見られなかつた。

- 3 4 -

以上の発現パターンから、発現クローニングを使う cDNA ライブラリーの SOURCE は RPMI8226 細胞が、また発現ライブラリーを導入してスクリーニングに使用する宿主細胞は NIH3T3 細胞が適切であると判断した。

〔実施例 2〕 2D7 抗原のクローニング

5 [1] 蛋白質からのクローニング

2D7 抗原を発現している RPMI8226 細胞、U266 細胞、および、2D7 抗原を発現していない NIH3T3 細胞より cell lysate を調製し、2D7 抗体で免疫沈降を行った。その結果、RPMI8226、U266 細胞で特異的に precipitate される分子 (～12kD) が確認された (図 3)。この分子は 2D7 抗体による western blot では検出されないが、少なくとも 2D7 抗体では再現良く precipitate されるので、2D7 抗原そのもの、あるいは、2D7 抗原との共沈分子であることが強く予想された。

そこで、このバンドをクマシ一染色した後切り出し、ペプチドシークエンスを行った。その結果、この 12kD の分子の正体は β 2 ミクログロブリン (β 2M) であることが分かった。 β 2M は HLA class I と非共有結合で会合するクラス I MHC 蛋白複合体の一つであることから、 β 2M は 2D7 抗体により HLA 複合体として共沈してきたものと考えられる。HLA class I は、抗原提示に必要な α 1、 α 2 ドメイン、及び、 β 2M と結合する α 3 ドメインから成る。2D7 抗体が β 2M 分子を共沈できることから、2D7 抗体は HLA class I の α 1- α 2 ドメインをエピトープとして認識していると予想される。

20 [2] 遺伝子の発現クローニング

2D7 抗原発現細胞 RPMI8226 より精製した mRNA からランダムヘキサマーにより cDNA を合成した。これをレトロウイルスベクター pMX2 に挿入し、レトロウイルス発現ライブラリーを作製した。ライブラリーのタイターを調べた結果、トータルで 6×10^6 クローンを含んでいることが分かった。また、このライブラリーより 25 24 個のクローンをランダムにピックアップしコロニー PCR によりインサートサイズを調べた結果、cDNA average length はおよそ 1.5kb であることが分かった。

従って、作製した発現ライブラリーは発現クローニングに十分使用可能であると判断した。

図 4 A および図 4 B に、以下のスクリーニングの流れを示す。一次スクリーニングでは 4000 個の independent なクローニングを 1 プールとして 24 プール (96000 クローニング相当) を作製し、各プラスミドを BOSC23 細胞にトランスフェクトすることでレトロウイルスにパッケージングした。その後得られた各プール由来ウイルスを NIH3T3 細胞に感染させた。感染 3 日後に細胞をはがし、2D7 抗体で染色した後 FACS により発現解析を行った。その結果、空ベクター由来のウイルス (コントロール) を感染させた NIH3T3 細胞と比較して 2D7 陽性細胞が認められたプールが 2 10 4 プール中 3 プールで認められた (プール 4、13、21)。

次に一次スクリーニングで陽性だったプール 4、プール 13 を 1000 個の independent なクローニングからなるプール 4 個に分割し二次スクリーニングを行った。その結果、各プールから一つずつ、明らかな陽性プールが認められた (図 5 A、プール 4-4、プール 13-1)。さらにプール 13-1 を 160 個の independent なクローニングからなるプール、21 個に分割し、三次スクリーニングを行い、二つの陽性プール (図 5 B、13-1-11、13-1-21) を同定した。続いてプール 13-1-11 を 20 個のクローニングからなるプール 8 個に分け四次スクリーニングを行い、陽性プール (図 5 C、13-1-11-5) を得た。

このプールを LB プレートに広げ 64 個のコロニーを一つずつ拾いそれぞれを 96 20 ウェルプレートに 1 ウェルずつ植菌した。縦の列 8 クローニング分を 1 プールとして 8 プール (1~8) を、また横の列 8 クローニング分を 1 プールとして 8 プール (A~H) を作製し、五次スクリーニングを行った。その結果、プール 3, 4, 6, 8 及びプール E, F, G が positive であったためこの結果から 12 個の positive 候補クローニングを絞ることができた (図 6 A)。この 12 個について FACS を行い、最終的に 4 つの positive クローニング (3F, 4G, 6E, 8G) が 2D7 抗体に認識される单一クローニングとして同定された (図 6 B)。

このクローンのインサート部分のシークエンスを読んだ結果、4つとも Human MHC class I HLA-A-6802 の全長 cDNA 配列であることが分かった。

HLA-A は数十種類ものハプロタイプに分類されている。今回のクローニングの結果、HLA class I の A*6802 というハプロタイプが 2D7 抗原として同定されたが、

5 2D7 抗体はかなり広範な細胞種を認識することから、遺伝子ソースとして使った RPMI8226 細胞での HLA class I のハプロタイプがたまたま A*6802 だったというだけであって、2D7 抗体は全てのハプロタイプを含む HLA class I 分子を認識する抗体であると考えられた。

[実施例 3] 増殖抑制効果についての検討

10 2D7 抗体が細胞殺傷作用を有しているかを、数種類の Leukemia 細胞株 (K562, Jurkat, RPMI8226) を使って調べてみた。なお、これら三株での 2D7 抗原の発現量は、K562(弱陽性), Jurkat, RPMI8226 (強陽性) であった。

15 K562, Jurkat 細胞を PHA と PMA 存在下、非存在下で撒き、そこに 2D7 抗体を 10 μ g/ml で加えた。24 時間後に細胞を観察した結果、2D7 弱陽性である K562 細胞では 2D7 抗体の有無でその形態に目立った差は認められなかつたが、2D7 を強く発現している Jurkat 細胞では 2D7 抗体の添加により著名な細胞凝集が観察された (図 7 B および図 7 C)。しかしながら、2D7 抗体添加による増殖抑制は観察されなかつた (図 7 A)。また PHA, PMA 刺激により活性化させた Jurkat 細胞においても 2D7 による増殖抑制は同様に見られなかつた。

20 さらに、2D7 強陽性細胞である RPMI8226 細胞においては予想に反して 2D7 抗体を添加しても、細胞の形態、増殖に目立つた影響を与えたなかつた (図 7 D)。

次に、2D7 抗体にさらに抗マウス IgG(Fc) 抗体を加え、抗体をクロスリンクさせることで細胞殺傷効果が見られるか調べた。Jurkat 細胞に 2D7 抗体存在下、非存在下で、さらに抗マウス IgG を加え培養を行い、48 時間後、細胞核を Hoechst33258 で染色し死細胞に特長的な細胞核の断片化が認められるか観察した (図 8)。その結果、Jurkat 細胞において、2D7 をさらに抗体でクロスリンクすることで核

- 3 7 -

の断片化が観察され、細胞死が誘導されていることが分かった。

[実施例 4] 2D7 抗体可変領域をコードする cDNA のクローニングおよび予想される Diabody の構造

マウス IgG2b の heavy chain, light chain の定常領域に対するプライマーを作
5 製し、5' RACE 法により 2D7 可変領域をコードする DNA のクローニングを行った。
得られた PCR 産物の塩基配列は配列番号： 1 および 2 に示したとおりである。

続いてこの配列をもとに single chain の構築を行った。図 9 および図 10 A に
示すように 2D7 single chain は、heavy chain のリーダーシークエンス、heavy
chain の可変領域、そして 5mer のリンカー (GGGGS) をはさんで light chain の
10 可変領域、その後ろに flag-tag をコードする cDNA (配列番号： 3) から構成さ
れる。2D7 Diabody はこの single chain が dimerize することで図 10 B に示す
ような構造を形成すると考えられる。

[実施例 5] 2D7 Diabody の細胞傷害活性解析

(i) COS7 で一過性に発現させた 2D7 Diabody の傷害活性

15 2D7 Diabody 発現ベクターを COS7 細胞にトランスフェクトし、3 日後に培養上
清を回収した。培養上清、及び cell lysate を SDS-PAGE し抗 Flag-tag 抗体で we
stern blot を行った結果、培養上清中に 2D7 single chain が分泌されているこ
とが確認された (図 10 C)。

この培養上清を Jurkat 細胞に 50% の割合で添加し数日後に細胞を PI、及び、A
20 nnexin V で染色することで死細胞の割合を測定した。Jurkat 細胞は、抗 BST-1 抗
体、2D7 抗体 (各 5 μ g/ml) を添加しただけではアポトシスマーカーに大きな変
動は認められなかった。また、ベクターのみをトランスフェクトした COS7 の培養
上清でも特に変化は認められなかった。一方、2D7DB を発現させた COS7 の培養上
清を加えた Jurkat 細胞では、明らかな細胞死誘導が認められた (図 11 A および
25 図 11 B)。

次に、この 2D7DB が HLA class I A 特異的に作用していることを調べる目的で、

HLA class I A を発現していないことが知られている K562 細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、2D7DB は Jurkat 細胞に対しては細胞死誘導活性を認めたものの、K562 細胞に対しては全く影響を及ぼさなかった（図 1 2 A および図 1 2 B）。このことから 2D7DB の細胞死誘導活性はそのエピトープである HLA class I A を標的にした作用であることが強く支持された。また、Jurkat 細胞の 2D7DB に対する感受性は con A で刺激した細胞の方が若干ではあるが高いような傾向が各データから認められた。

次に他のミエローマ細胞株に対する 2D7DB の作用を解析した。RPMI8226, IL-KM 3, U266, ARH77 をベクターのみをトランスフェクトした培養上清（コントロール）、あるいは 2D7DB 発現 COS7 培養上清とインキュベートし、二日後に Annexin V, PI で二重染色し Flow cytometer で解析した。その結果いずれの細胞も 2D7DB とのインキュベートにより顕著に細胞死が誘導されることが明らかになった（図 1 3 A～図 1 3 D）。

(ii) 精製した 2D7DB の細胞傷害活性

精製した 2D7DB の各種細胞株（RPMI8226, ARH77, U266, Jurkat）に対する増殖抑制効果について解析した。2D7DB を 0, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/ml で添加し 3 日後に細胞数を測定した。その結果、これらの細胞に対して濃度依存的に細胞増殖を抑制することが分かった（図 1 4）。

次に、精製 2D7DB を添加し 48 時間後に細胞死マーカーである PI, Annexin V で染めて解析を行った。その結果、COS7 で一過性に発現させた 2D7DB を用いた時の結果と同様に Jurkat, ARH77 に対して濃度依存的に細胞死を誘導し、K562 にはまったく影響を与えないことが明らかになった（図 1 5 A～図 1 5 C）。また U266, IL-KM3 に対しても 2D7DB 添加 48 時間後に著しい細胞死誘導活性が認められた（図 1 6 A および図 1 6 B）。

一方、付着細胞である HeLa 細胞に対しては、この細胞は 2D7 抗体で非常によく染色されるにも関わらず、同条件で 2D7DB は全く影響を及ぼさなかった（図 1 5）。

D)。このことから、2D7DB は血球系細胞など浮遊細胞にのみ特異的に作用する可能性が示唆された。

続いて、2D7DB による細胞死誘導活性がどれくらいの時間で誘導されるか解析した。ARH77, Jurkat 細胞に 2D7DB を $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、12、24、38 時間後に細

5 細胞を回収し、細胞死マーカーで染色した。その結果、いずれの細胞も 12 時間後で既に細胞死が誘導されていることが判った（図 17 A および図 17 B）。そこで、

さらに早い時間（3 時間、6 時間）における細胞死誘導を調べた。驚いたことに 2 D7DB は添加してから少なくとも 3 時間以内に細胞死を誘導することが実験から明

らかになった（図 18 A および図 18 B）。これらの結果から 2D7DB は非常に強力な細胞死誘導活性を有することが強く支持された。このように 2D7DB は強力に

10 細胞死を誘導するので、短い血中半減期でも十分な薬効が期待できる。さらに、^w

hole 抗体が仮に強力な細胞死誘導活性を有した場合には、血中半減期の長さから安全性の問題が懸念されるが、Diabody 化することにより、そのような問題もクリアされることが考えられる。

15 次に、2D7DB による細胞死がカスパーゼの活性化を伴って引き起こされる、いわゆるアポトーシスによるものかどうかについて解析を行った。図 19、図 20

で示すように ARH77, Jurkat 細胞をアポトーシス誘導剤である Actinomycin D で処理し 16 時間後に Annexin V, PI で細胞を染色すると顕著にアポトーシスが誘導

された。この条件下であらかじめ細胞をカスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK で 2.

20 5 時間前処理すると Actinomycin D によるアポトーシスは抑制された。ところが、

2D7DB によって誘導される細胞死は Z-VAD-FMK による前処理を行ってもまったく

阻害されなかった。これらの結果から、2D7DB はカスパーゼを介した通常のアポトーシスの機構とは異なる別の機構によって細胞死を誘導していることが明らか

になった。

25 さらにこのことを確認するため、アポトーシスに伴う最も特徴的生化学的変化として知られているクロマチン DNA の断片化に関する解析を行った。

- 4 0 -

ARH77, Jurkat 細胞を 2D7DB ($2 \mu\text{g/ml}$)、あるいは Actinomycin D で処理し 24 時間後に DNA を回収し、電気泳動を行った (図 21)。その結果、アポトーシス誘導剤である Actinomycin D 処理した細胞はいずれもアポトーシスの特徴である DNA の断片化が誘導されていたが、その一方で、2D7DB 処理した細胞では完全に細胞死を誘導しうる濃度の 2D7DB を添加しているにも関わらず DNA の断片化は全く認められなかった。この結果からも、2D7DB による細胞死は、アポトーシスの特徴を伴わない未知の細胞死であることが強く支持された。

以上の結果より 2D7DB による細胞死はこれまで知られている細胞死誘導機構とは異なる経路を介して引き起こされていることが分かった。そこで、2D7DB による細胞死誘導のメカニズムを明らかにするため、さらに解析を行った。これまでの実験から、細胞に 2D7DB を反応させると細胞膜が破壊されている様子が顕微鏡下でしばしば観察されていた。このことから、2D7DB がアクチン骨格系に何らかの影響を及ぼしていると推測した。その可能性に関して検討するため、アクチン重合阻害剤 (サイトカラシン D) を細胞に作用させ、2D7DB の細胞死誘導活性に対する影響について解析を行った。

ARH77 細胞にサイトカラシン D ($20 \mu\text{g/ml}$) を、またはエタノールのみ (コントロール) を添加し、1 時間後に 2D7DB を各濃度で加えた。2D7DB 添加から 4 時間インキュベート後に細胞を回収し、PI 染色を行い死細胞の割合を測定した (図 22)。その結果、サイトカラシン D であらかじめ細胞を処理することにより、2D7DB に対する感受性が消失することが分かった。この結果から、2D7DB はその標的分子である HLA-class I A に結合することで、アクチンなど細胞骨格系に何らかの作用を及ぼし細胞死を誘導することが示唆された。

そこで、2D7DB を作用させた細胞をアクチン抗体で染色し、2D7DB の添加による細胞骨格系の動態変化について視覚的な解析を行った。ARH77 細胞に 2D7DB を作用させ 15 分後にメタノールで固定し細胞内のアクチン (赤) の様子を免疫染色により調べた (図 23)。その結果、2D7DB 非処理の像に比べて、2D7DB により細胞内ア

- 4.1 -

クチン骨格系が著しく破綻している様子が観察された。

以上の結果から、2D7DBによる細胞死は、HLA class IAに結合した2D7DBが細胞内アクチン骨格系を破壊することで引き起こされている可能性が強く示唆された。これは、これまで報告されていない、全く新しいタイプの細胞死誘導機構である。

5 [実施例 6] 2D7 diabody のヒト骨髄腫モデル動物での薬効試験

(1) ヒト骨髄腫マウスモデルの作製

ヒト骨髄腫マウスモデルは以下のように作製した。ARH77 細胞 (ATCC) を 10% ウシ胎児血清 (GIBCO BRL 社製) を含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社製) で 2.5×10^7 個/mL になるように調製し、あらかじめ前日抗アシアロ GM1 抗体 (和光純 10 薬社製) 0.2 mg を腹腔内投与した SCID マウス (オス、6 週齢、日本クレア) に 上記 ARH77 細胞懸濁液 200 μ L (5×10^6 個/マウス) を尾静脈より注入した。

(2) 投与抗体の調製

2D7diabody を投与当日、濾過滅菌した PBS (-) を用いて、0.8 mg/mL になるよう に調製し、投与試料とした。

15 (3) 抗体投与

(1) で作製したヒト骨髄腫マウスモデルに対し、ARH77 細胞移植後 1 日目より、1 日 2 回、3 日間、上記 (2) で調製した投与試料を 10 mL/kg にて、尾静脈より投与した。陰性対照 (vehicle) として、濾過滅菌した PBS (-) を同様に 1 日 2 回、3 日間、10 mL/kg にて、尾静脈より投与した。抗体投与群は 1 群 7 匹、vehicle 投与群は 1 群 8 匹で行った。

(4) マウス血清ヒト IgG 定量法

マウス血清中における、ヒト骨髄腫細胞が産生するヒト IgG の定量は、以下の ELISA で行った。0.1% 重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1 μ g/mL に希釈したヤギ抗ヒト IgG 抗体 (BIOSOURCE 社製) 100 μ L を 96 ウエルプレート (Nunc 社製) に加え、 25 4 °C で一晩インキュベーションし、抗体を固相化した。ブロッキングの後、段階 希釈したマウス血清あるいは標品としてヒト IgG (Cappel 社製) 100 μ L を添加し、

- 4 2 -

室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフオスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (BIOSOURCE 社製) 100 μ L を加え、室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (BioRad 社製) を用いて 405 nm の吸光度を測定し、標品のヒト IgG の吸光度より得られた検量線から、マウス血清中のヒト IgG 濃度を算出した。

(5) 抗腫瘍効果の評価

2D7diabody のヒト骨髄腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果については、当該骨髄腫細胞が産生するヒト IgG (Mタンパク質) のマウス血清中の量の変化、及び生存期間で評価した。マウス血清中のヒト IgG 量の変化については、ARH77 細胞移植後 24 日目に血清を採取し、上記 (4) で述べた ELISA を用いてヒト IgG 量を測定した。その結果、Vehicle 投与群では、血清ヒト IgG (Mタンパク質) 量が約 74 μ g/mL まで上昇しているのに対し、2D7diabody 投与群では対照群に比べ有意に低く (P<0.005, 対応のない t 検定) 、2D7diabody が ARH77 細胞の増殖を非常に強く抑制していることが示された (図 24)。一方、生存期間についても図 25 に示すとおり、2D7diabody 投与群では vehicle 投与群と比較して有意な生存期間の延長が認められた。

以上より、2D7diabody がヒト骨髄腫マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。本発明の 2D7diabody の抗腫瘍効果は、当該抗体が有する細胞死誘起作用に基づくと考えられる。

[実施例 7] PBMC に対する 2D7DB の作用解析

ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell、PBMC) に対する 2D7DB の作用を解析した。健康成人ボランティアの末梢血より比重遠心分離にて PBMC を精製した。この PBMC をマイトゲン存在下または非存在下で 24 穴プレートに 5 \times 10⁵ cells /1 mL / ウェルずつ播いた。マイトゲンにはフィトヘマグルチニン M (PHA-M、Roche Diagnostics、終濃度 10 μ g/mL)、コンカナバリン A (ConA、Wako、

- 4 3 -

終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$)、 SAC (Pansorbin Cells、 Calbiochem、 終濃度 0.01%) を用いた。 5% CO_2 インキュベーターにて 37°C にて 3 日間培養し、 培養終了の 24 時間前または 3 時間前に 2D7DB を終濃度 $2 \mu\text{g/mL}$ になるように添加した。 培養終了後に Annexin V、 PI で二重染色し (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I、 Pharmingen) フローサイトメーター (EPICS XL、 Coulter) にて解析した。 なお陽性対照として マイトゲン非存在下にて、 ARH77 を $2.5 \times 10^6 \text{ cells /1 mL / ウエル}$ ずつ 24 時間培養し、 PBMC と同様にして 2D7DB と反応させた。

PBMC の場合、 Annexin V・PI 共陽性である死細胞の割合はマイトゲン非存在下では、 29%、 23%、 25% (順に 2D7DB 非添加、 3 時間添加、 24 時間添加、 以下同)、 10 PHA-M 存在下では、 20%、 45%、 42%、 ConA 存在下では、 22%、 30%、 34%、 SAC 存在下では、 31%、 38%、 40% であった (図 26 A～図 26 D)。 ARH77 の場合、 16%、 56%、 58% であった (図 26 E)。 以上から 2D7DB は無刺激の PBMC にはほとんど影響を与えることなく、 マイトゲンにて活性化した PBMC に短時間で細胞死を誘導することが明らかとなった。

15

産業上の利用の可能性

本発明によって、 高比活性の低分子化抗体を提供できるものと期待される。 該低分子化抗体を使用することで、 短い半減期でも十分な薬効が期待でき、 さらに、 薬効と毒性の乖離が可能になるものと期待できる。 また、 臨床投与量の低減化および生産コストの低減化など、 コスト全体の低減化が図れるので抗体医薬品の開発上問題になる経済面問題の改善もまた期待される。

請求の範囲

1. 配列番号：13、14、15に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含む低分子化抗体。
- 5 2. 請求項1の低分子化抗体の重鎖CDRアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる重鎖CDRを有する低分子化抗体であって、請求項1に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- 10 3. 配列番号：16、17、18に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む低分子化抗体。
4. 請求項3の低分子化抗体の軽鎖CDRアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなる軽鎖CDRを有する低分子化抗体であって、請求項3に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- 15 5. 配列番号：13、14、15に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、及び配列番号：16、17、18に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む低分子化抗体。
6. 請求項5の低分子化抗体のCDRアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるCDRを有する低分子化抗体であって、請求項5に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- 20 7. 低分子化抗体がDiabodyである請求項1～請求項6のいずれかに記載の低分子化抗体。
8. 請求項1～請求項7のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。
- 25 9. B細胞またはT細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、請求項

- 4 5 -

8 に記載の細胞死誘導剤。

10. B 細胞または T 細胞が、活性化 B 細胞または活性化 T 細胞である、請求項 9 に記載の細胞死誘導剤。

11. 請求項 1 ～ 請求項 7 のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

12. 請求項 1 ～ 請求項 7 のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

13. 腫瘍が血液腫瘍である請求項 12 に記載の抗腫瘍剤。

14. 請求項 1 ～ 請求項 7 のいずれかに記載の低分子化抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

10

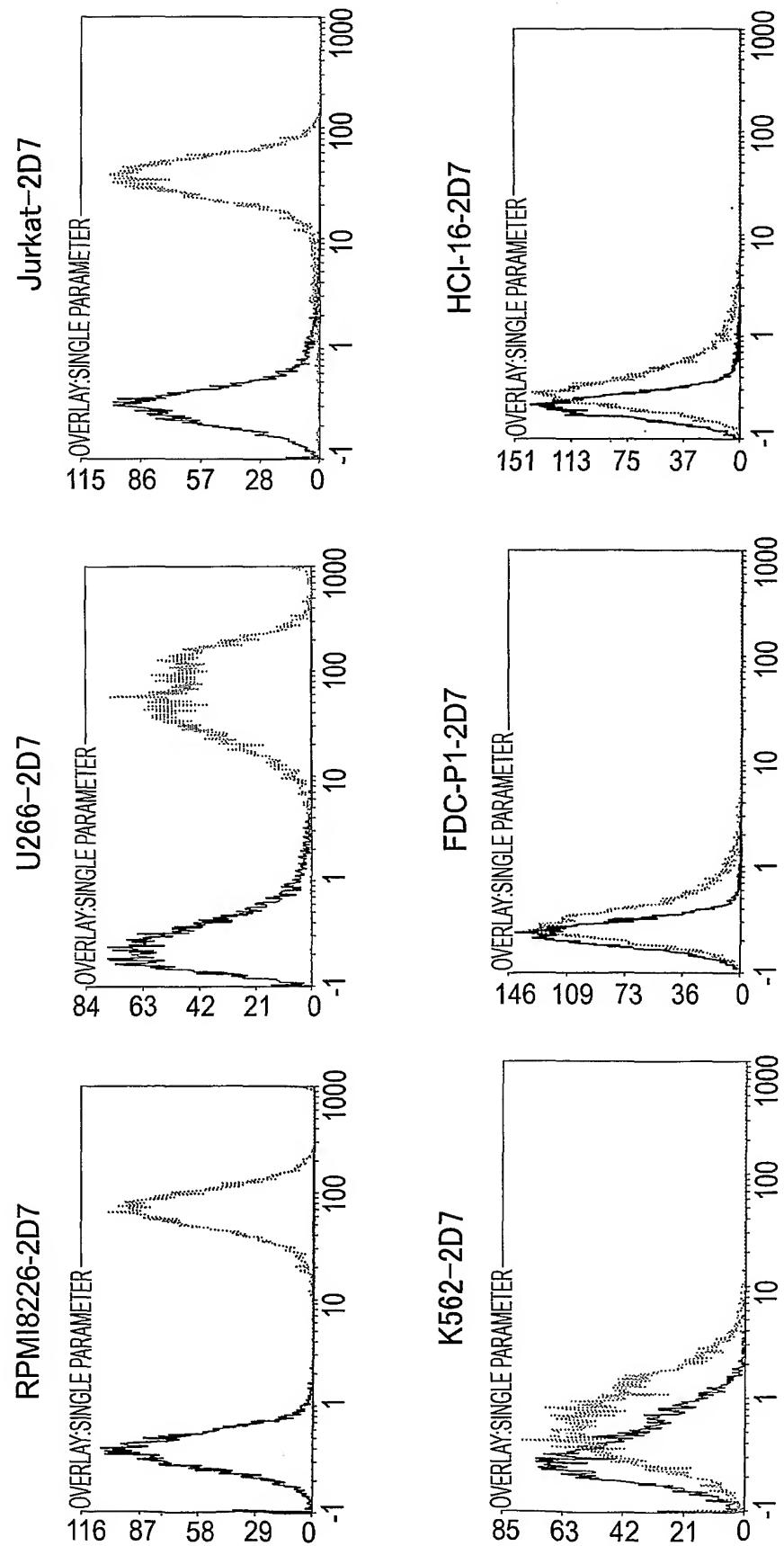
1 / 3 7

図 1

5' -AATTCCCAGCACAGTGGTAGATAAGTAAG(配列番号:5)
GGGTCGTGTCAACCATCTATTCAATTAGCT-5' (配列番号:6)

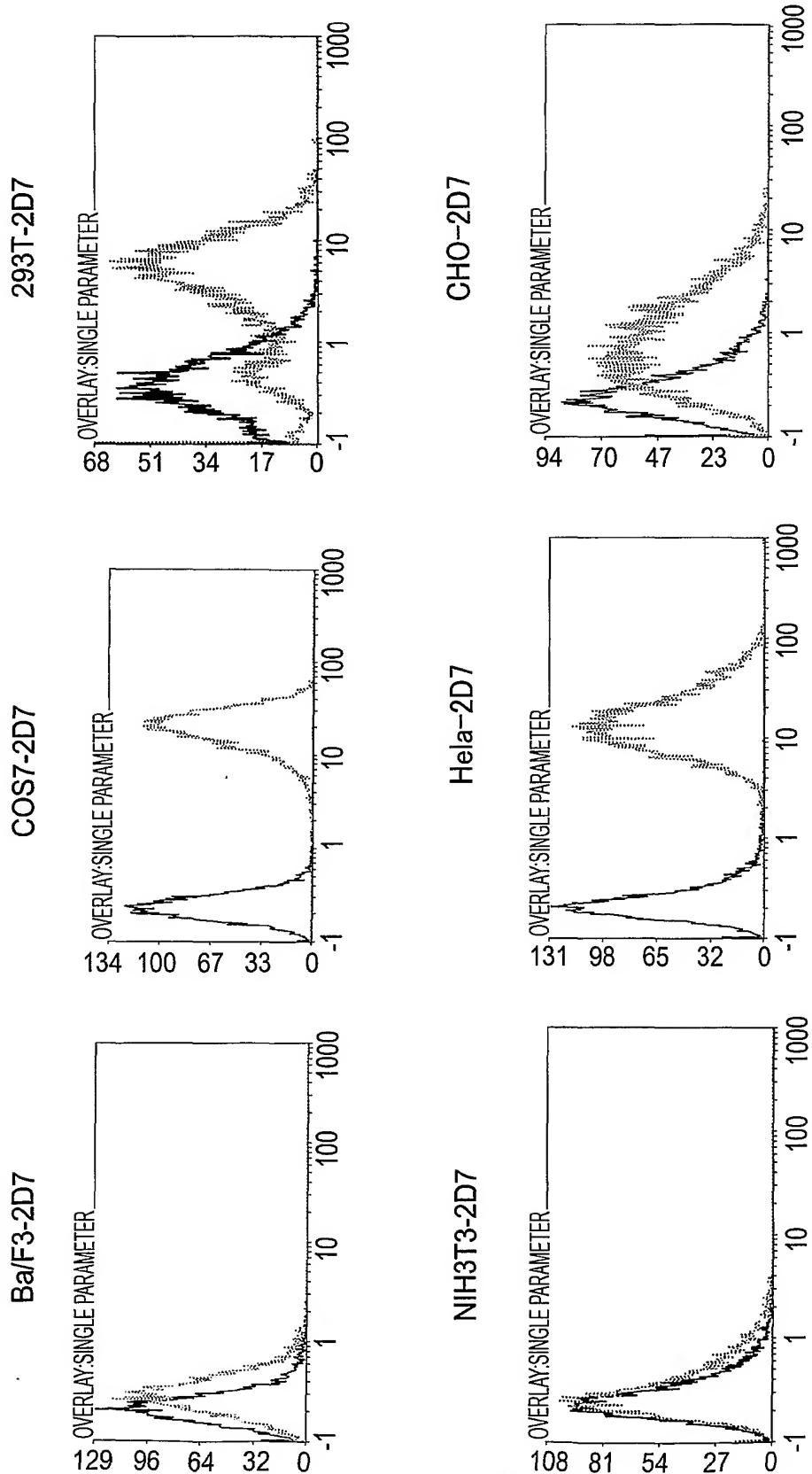
2 / 37

図 2 A



3 / 37

図 2 B



4 / 37

図 3

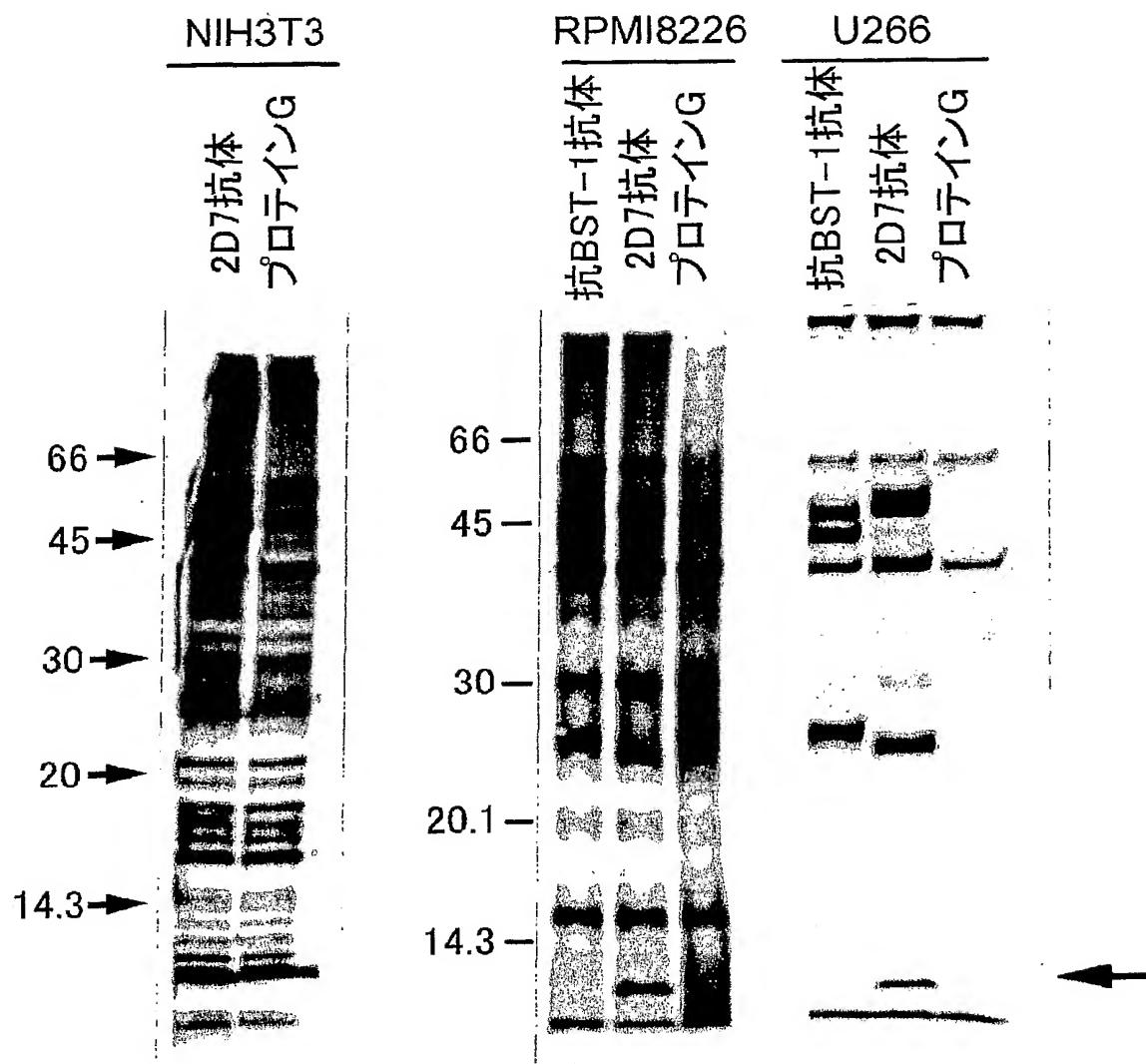


図4A

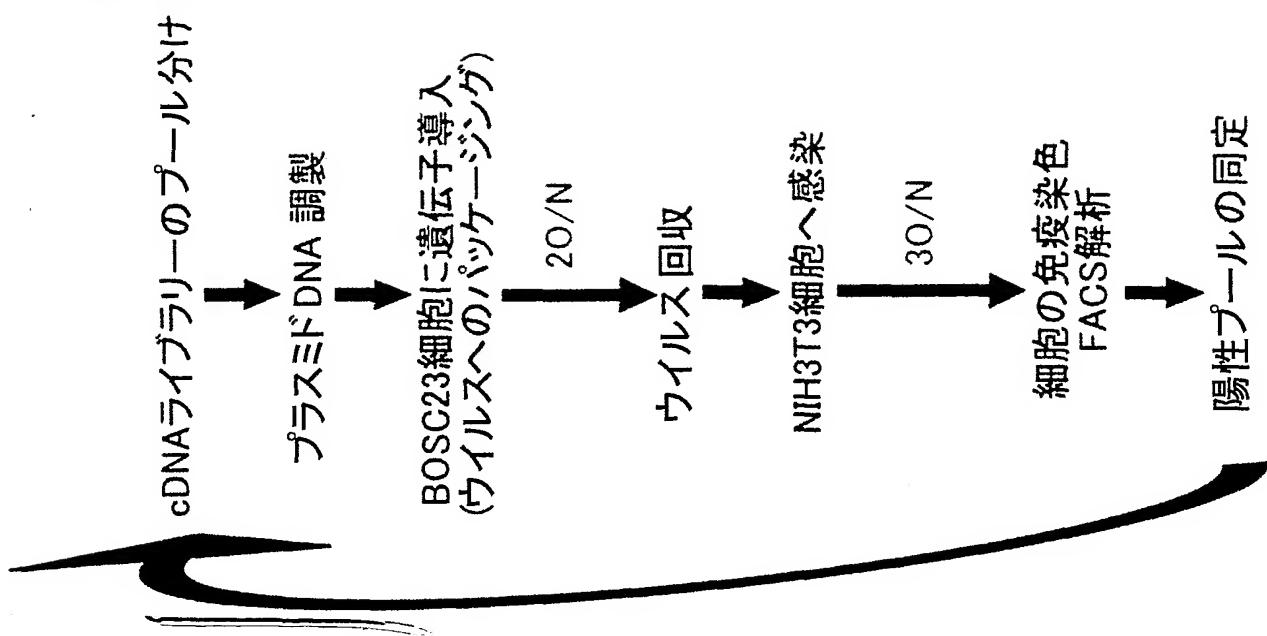


図 4 B

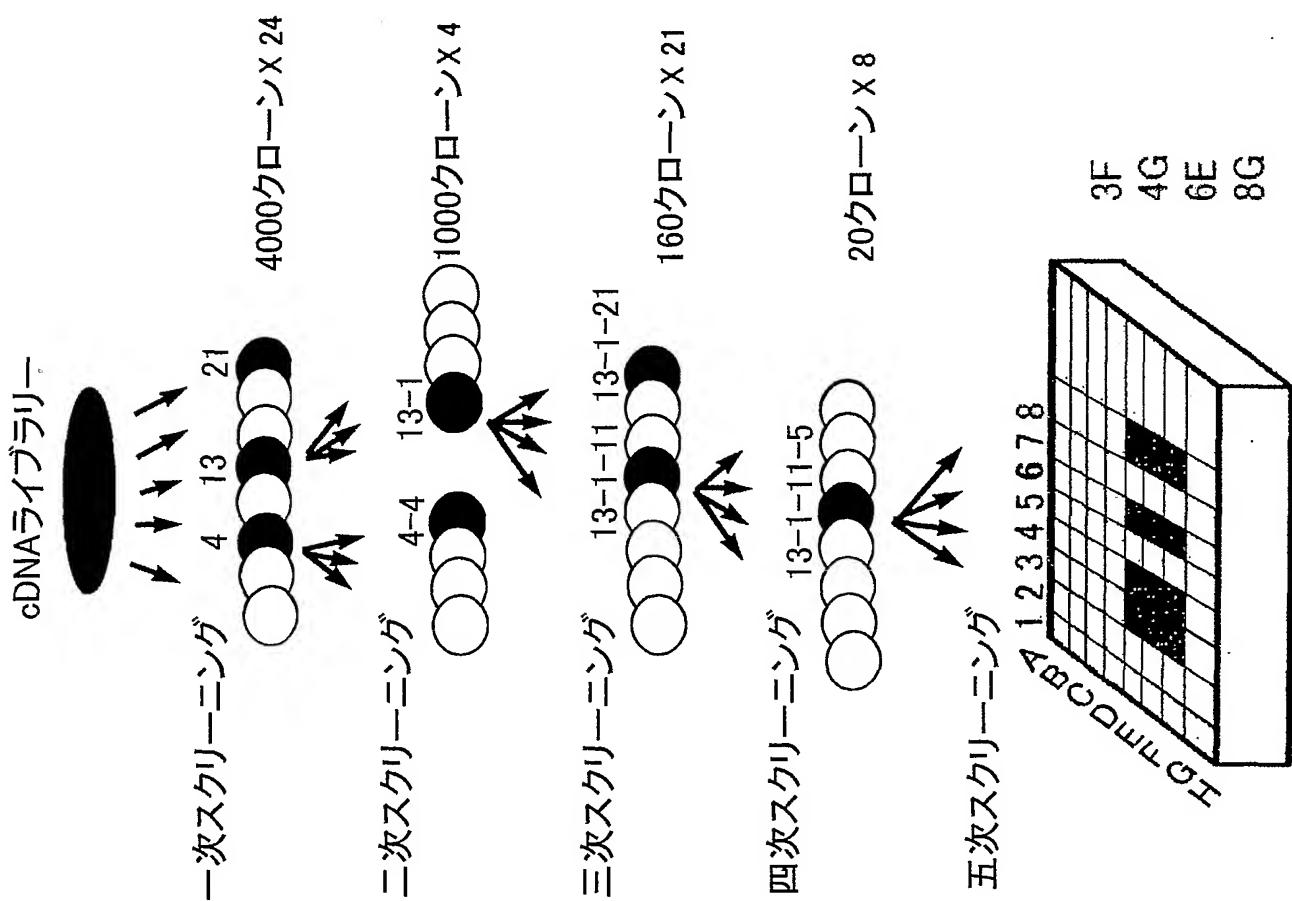
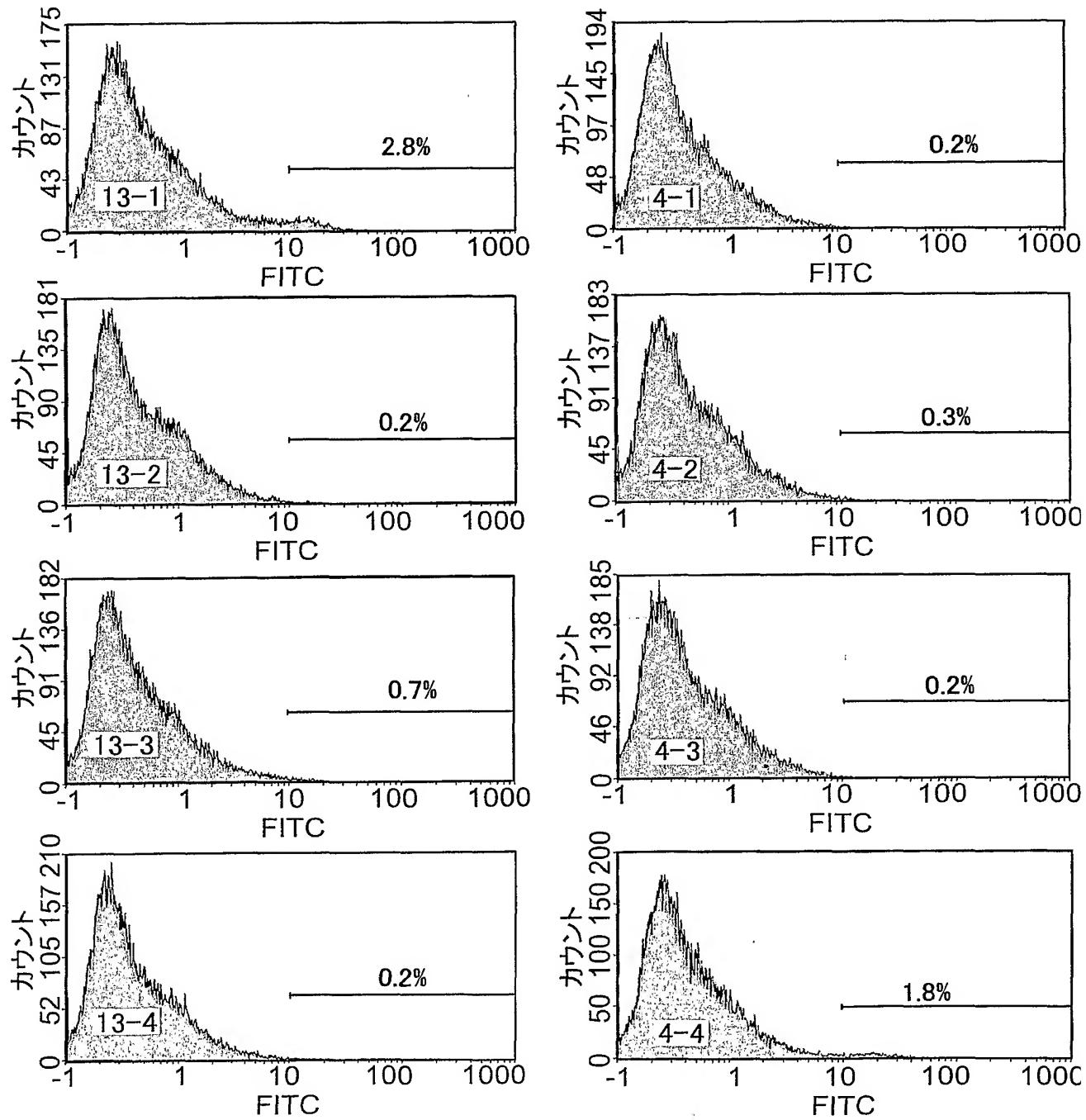
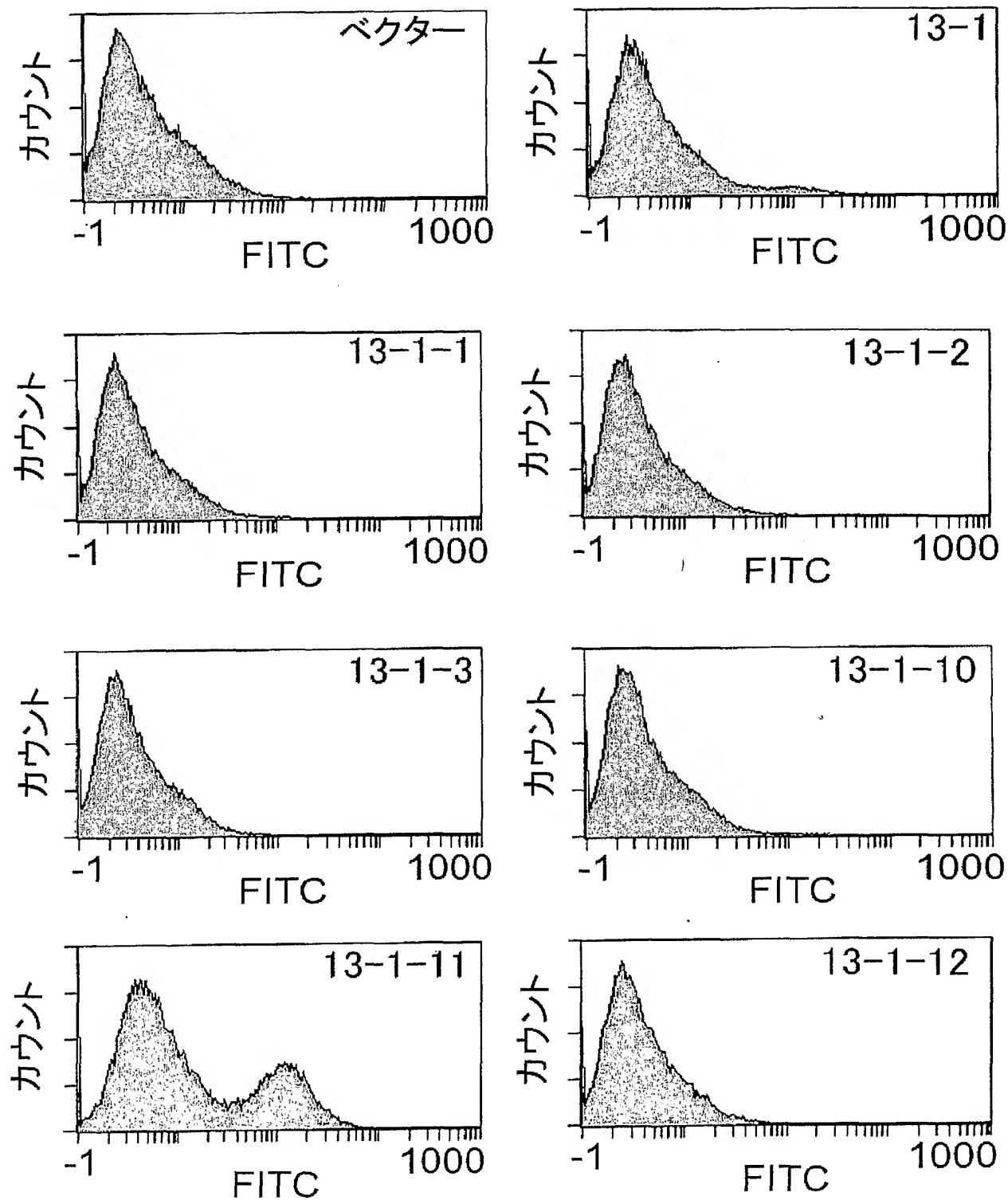


図 5 A



7 / 37

図 5 B



8 / 37

図 5 C

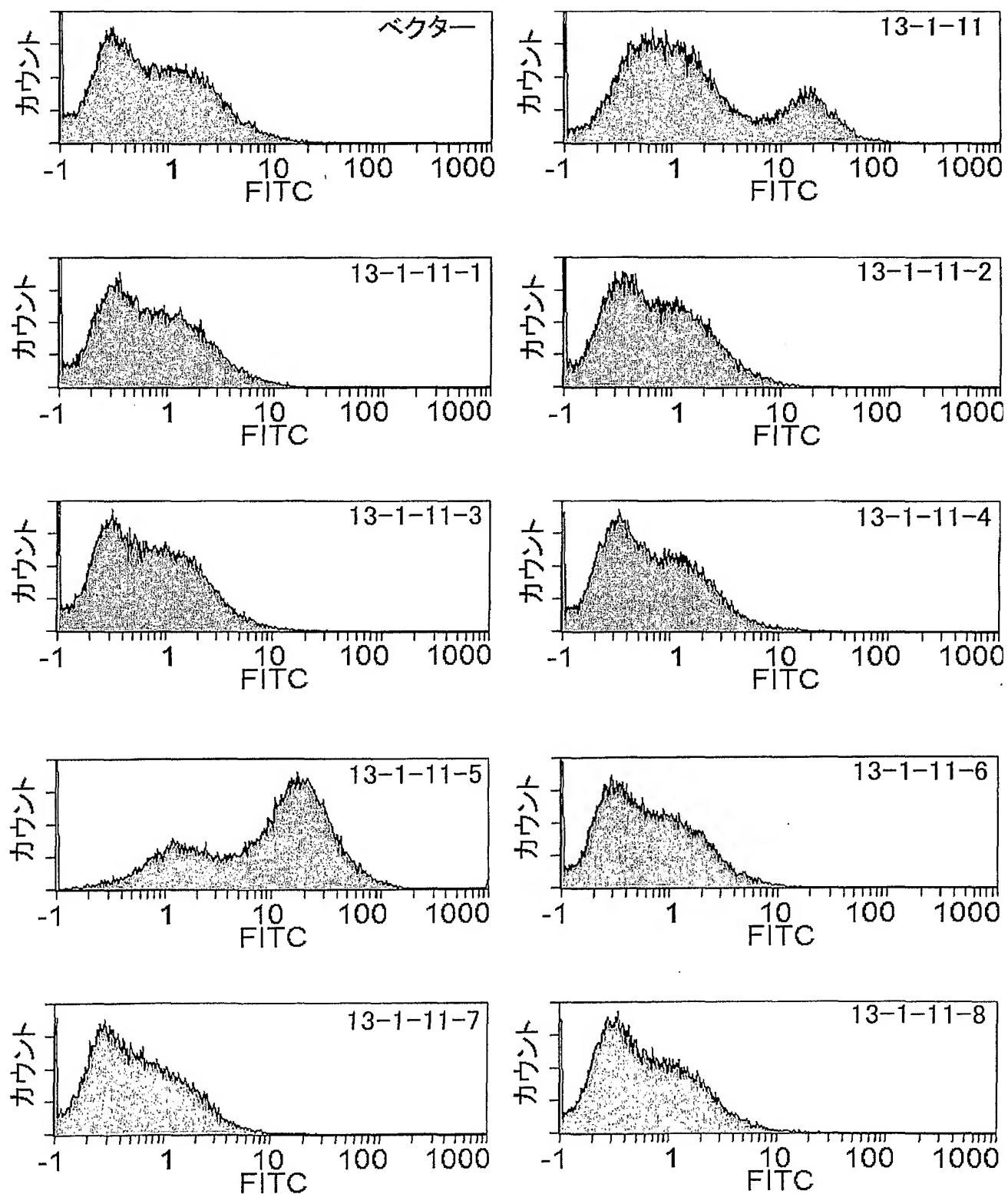
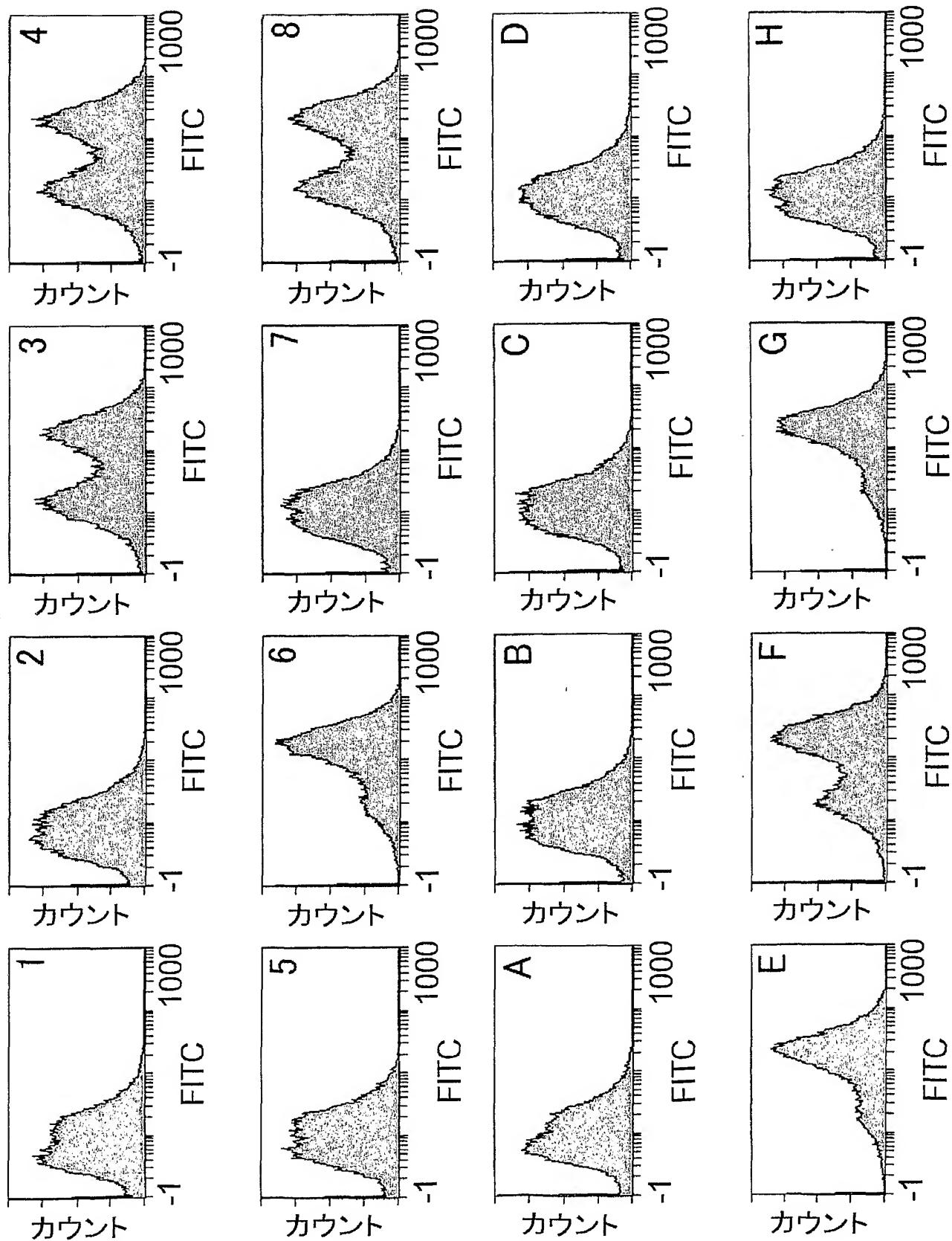
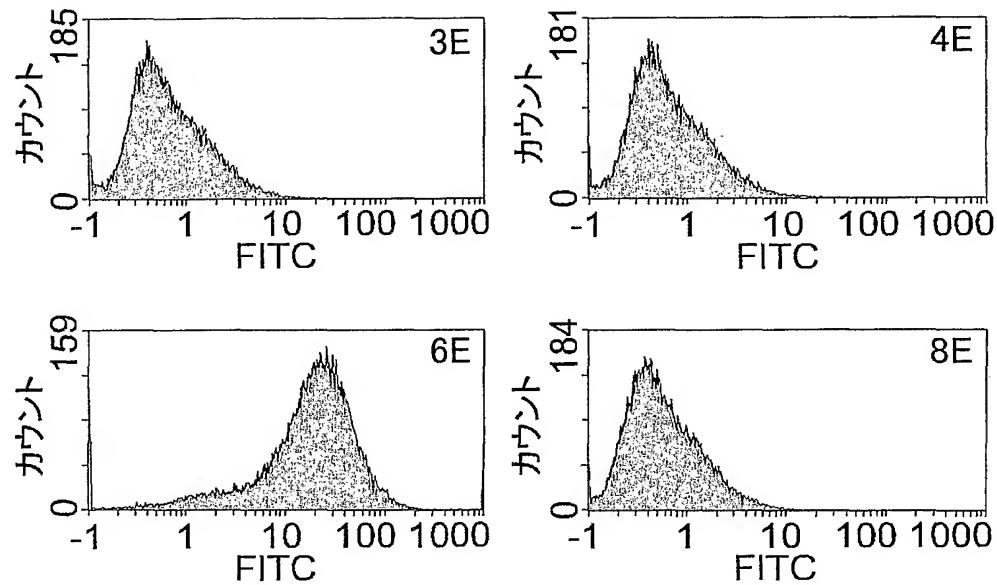


図 6 A



10 / 37

図 6 B



11/37

図 7 A

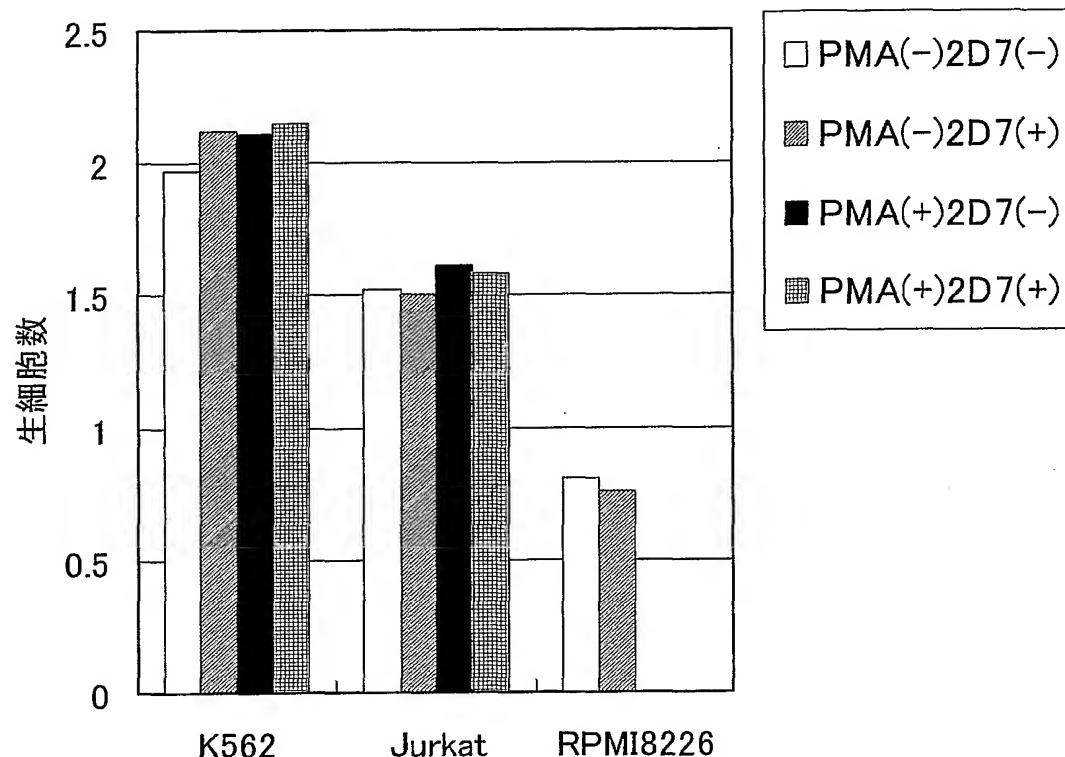


図 7 B

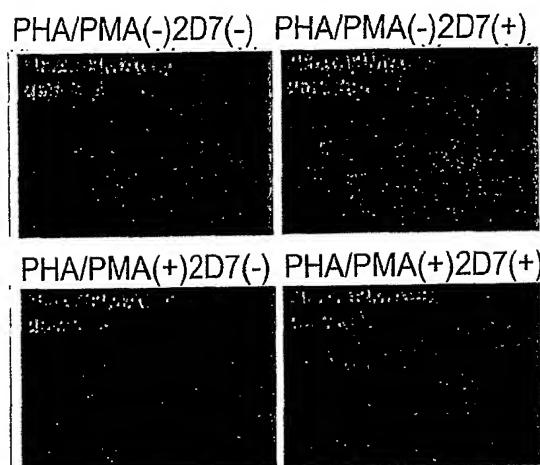


図 7 C

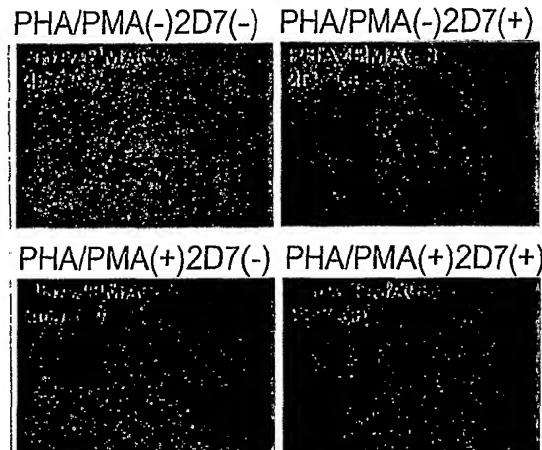
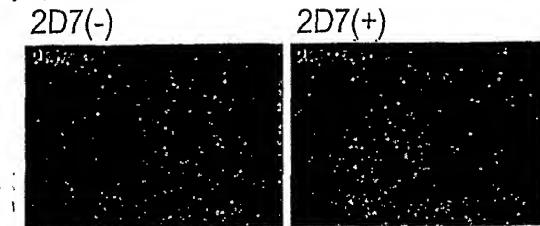
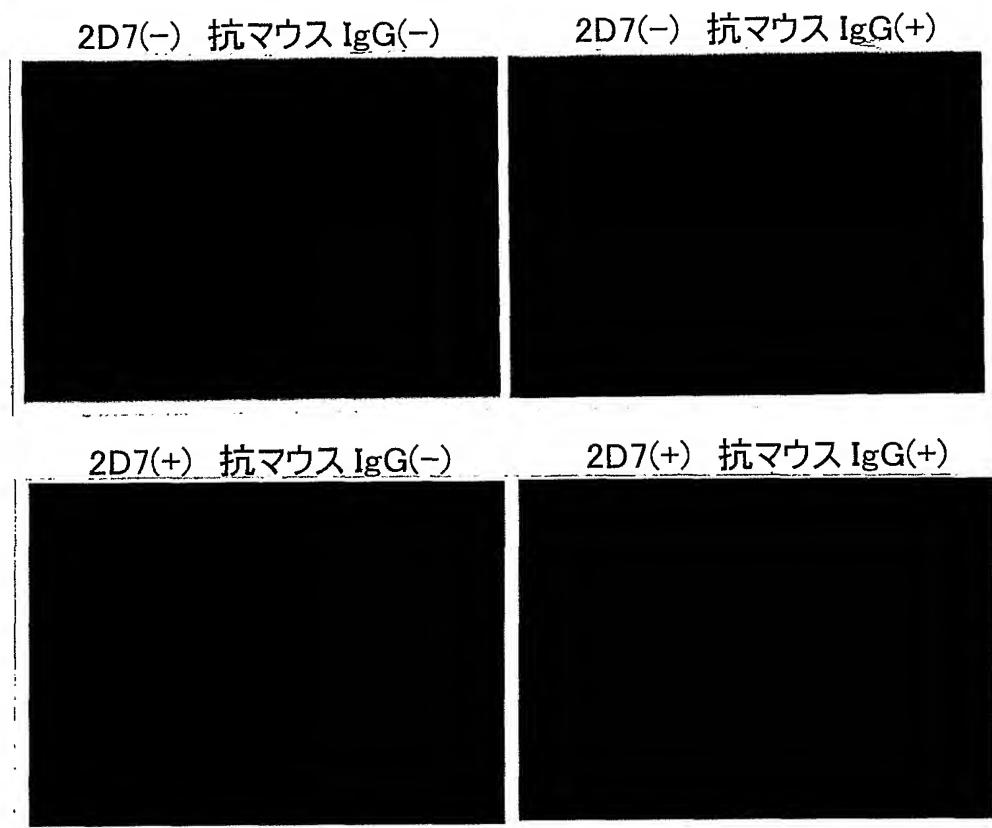


図 7 D



1 2 / 3 7

図 8



14 / 37

図 10 A

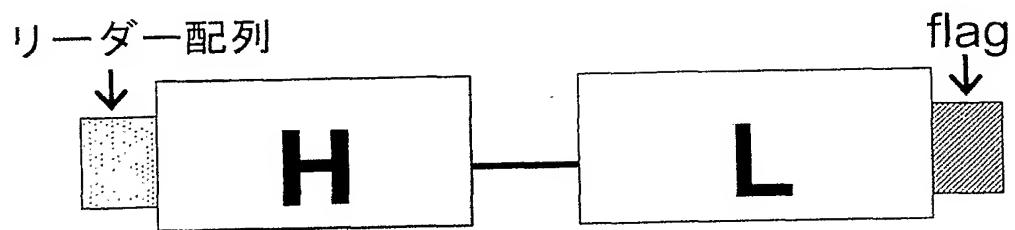


図 10 B

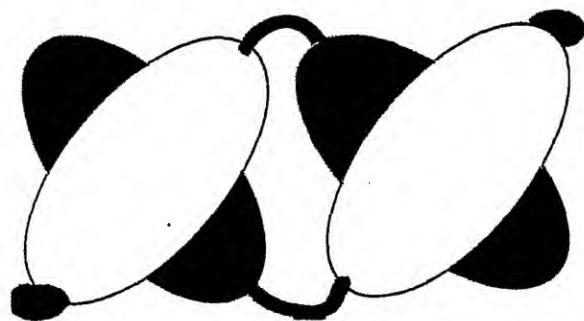
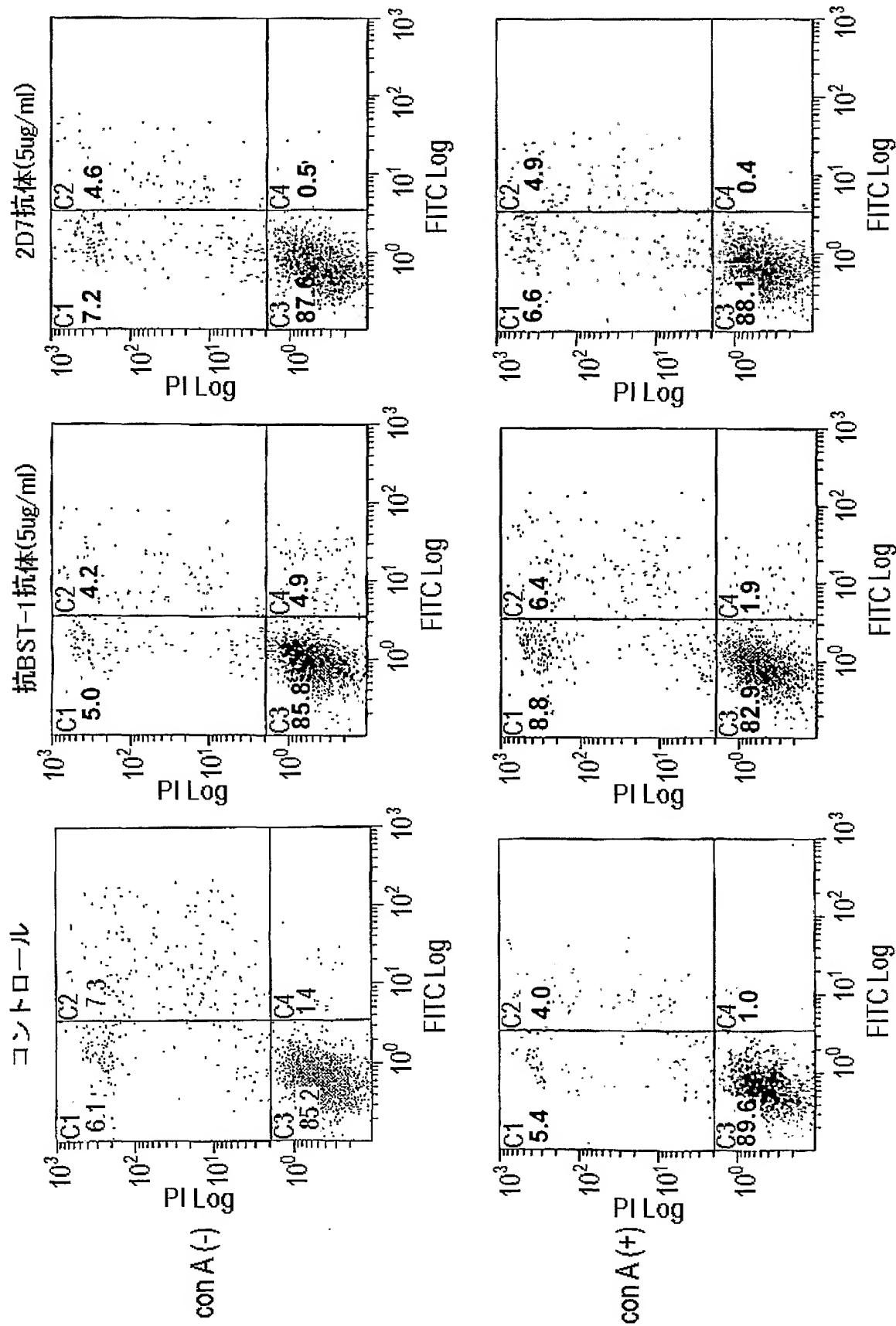


図 10 C



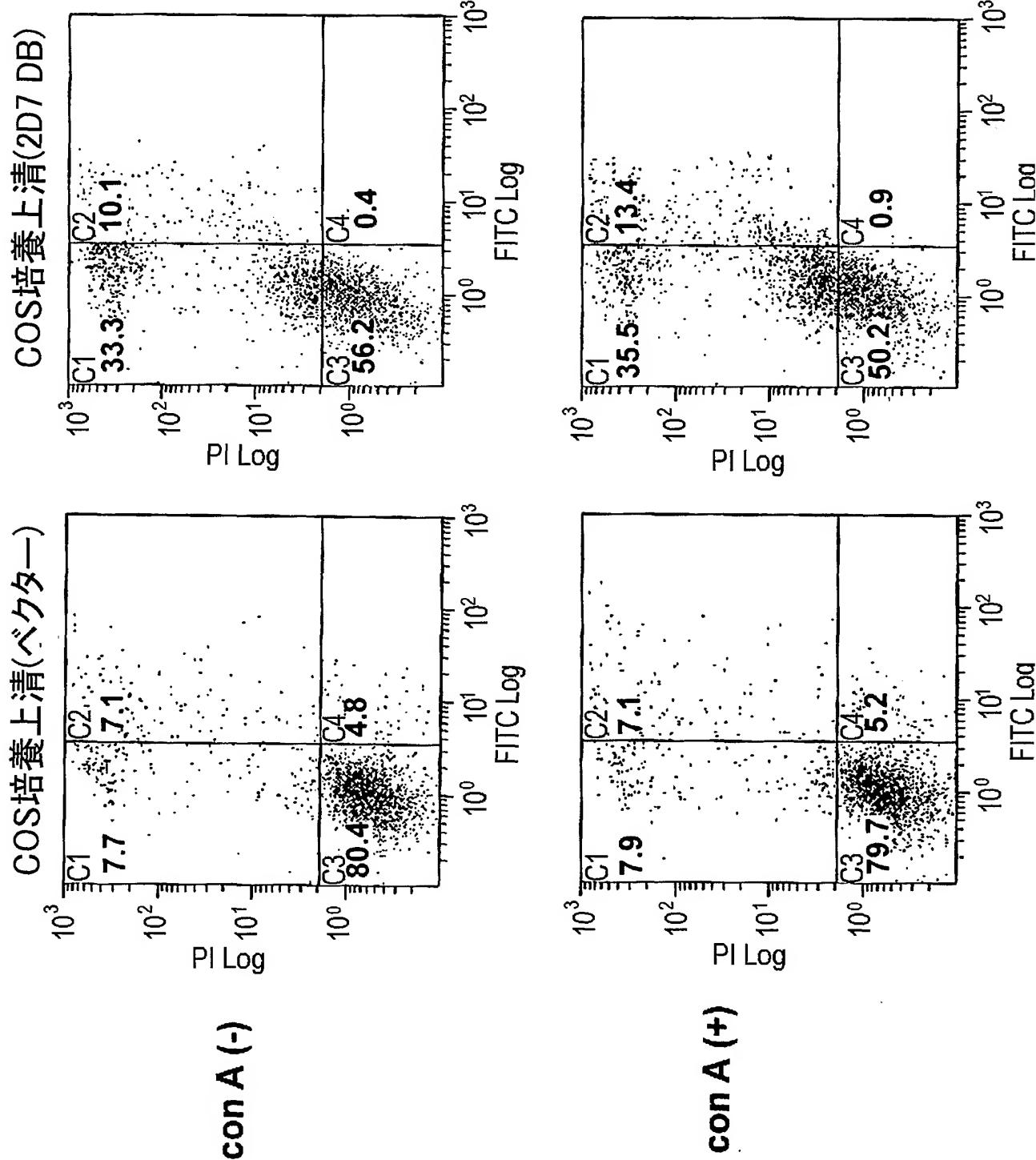
15/37

図 11A



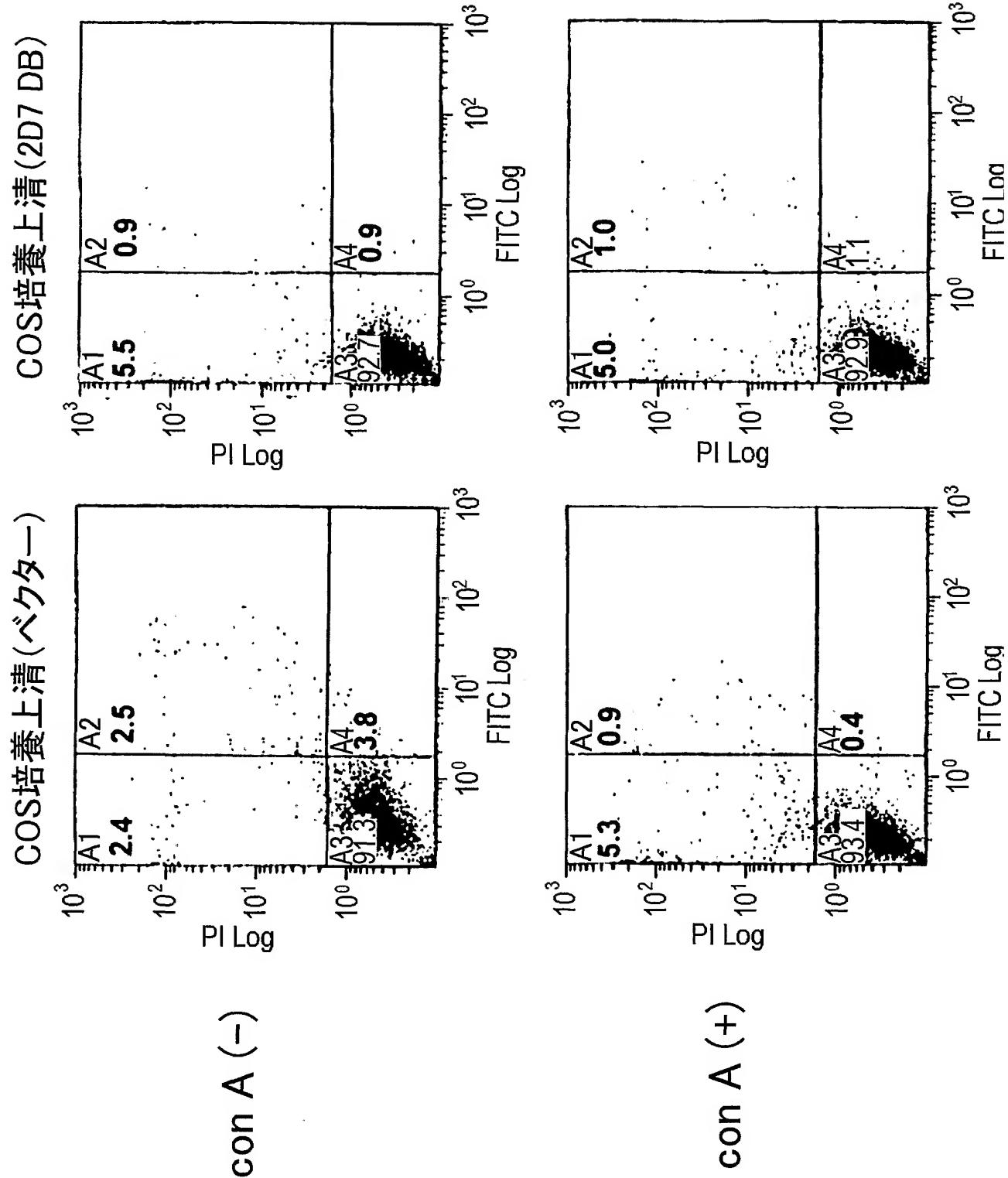
16 / 37

図 11B



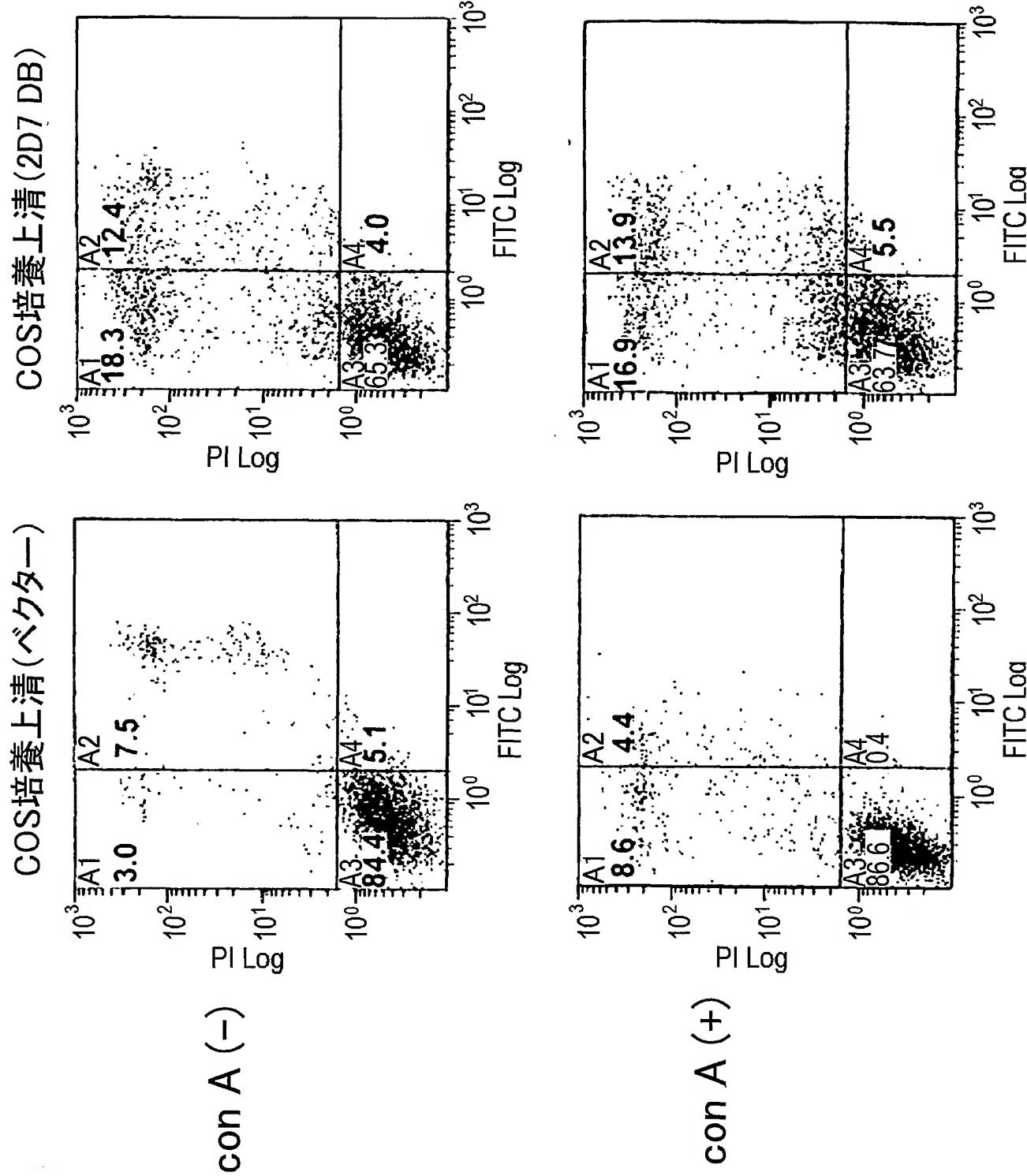
17 / 37

図 12 A



18 / 37

図 12B



1 9 / 3 7

図 1 3 A

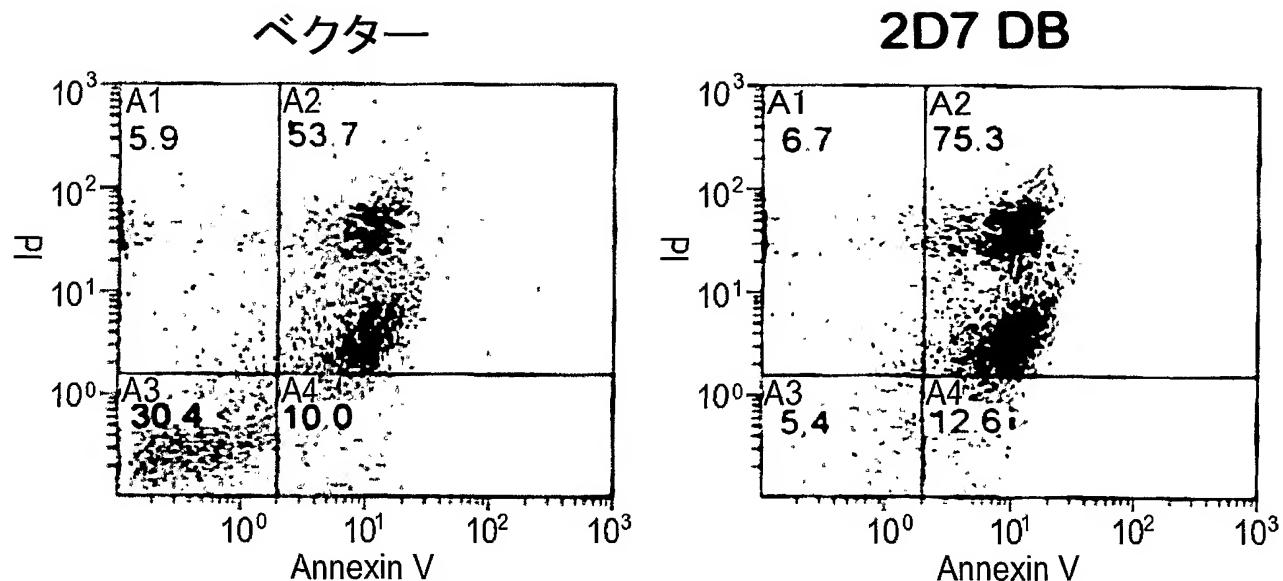
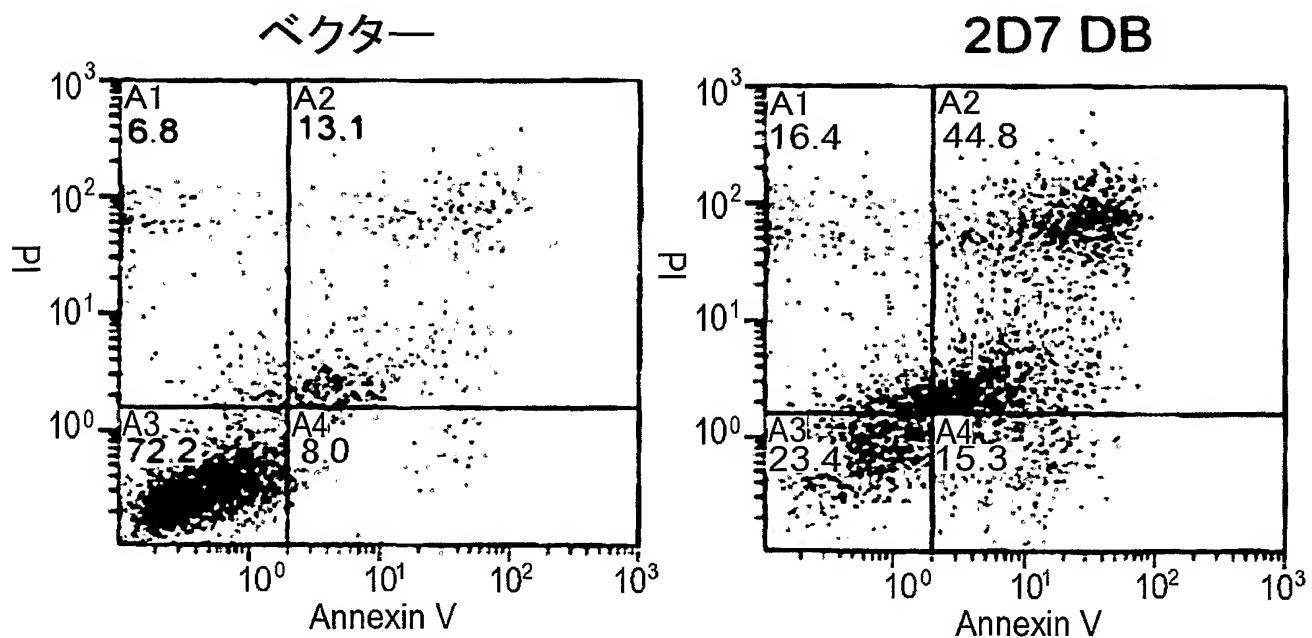


図 1 3 B



20 / 37

図 13 C

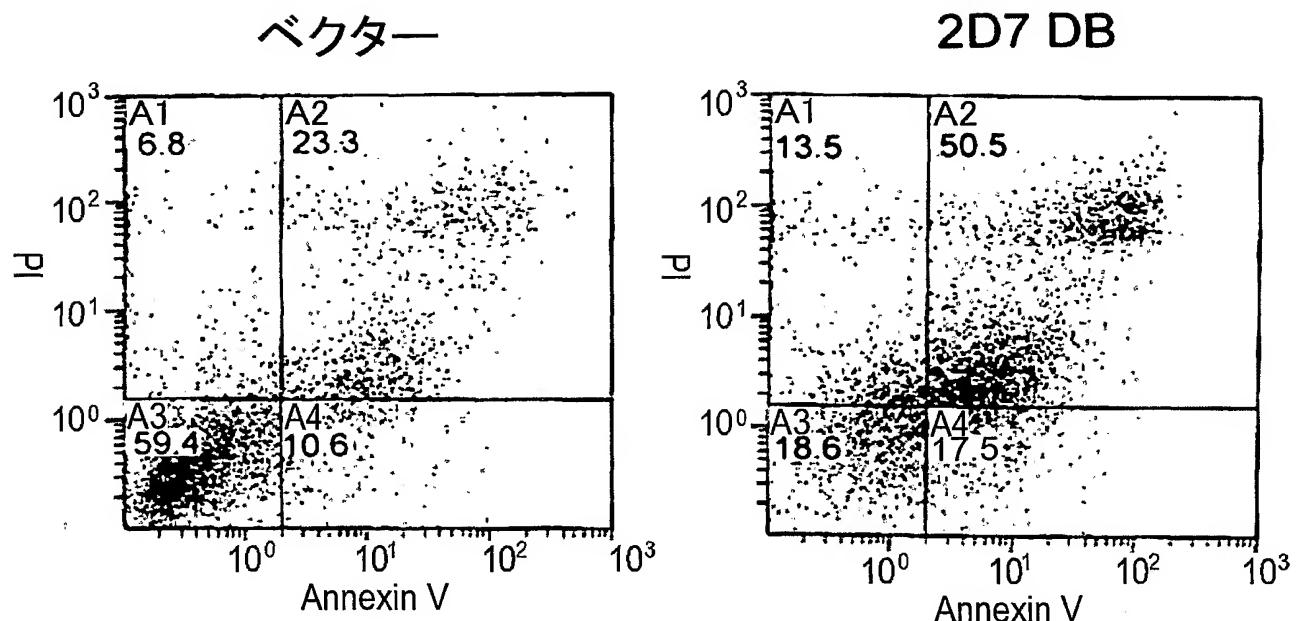
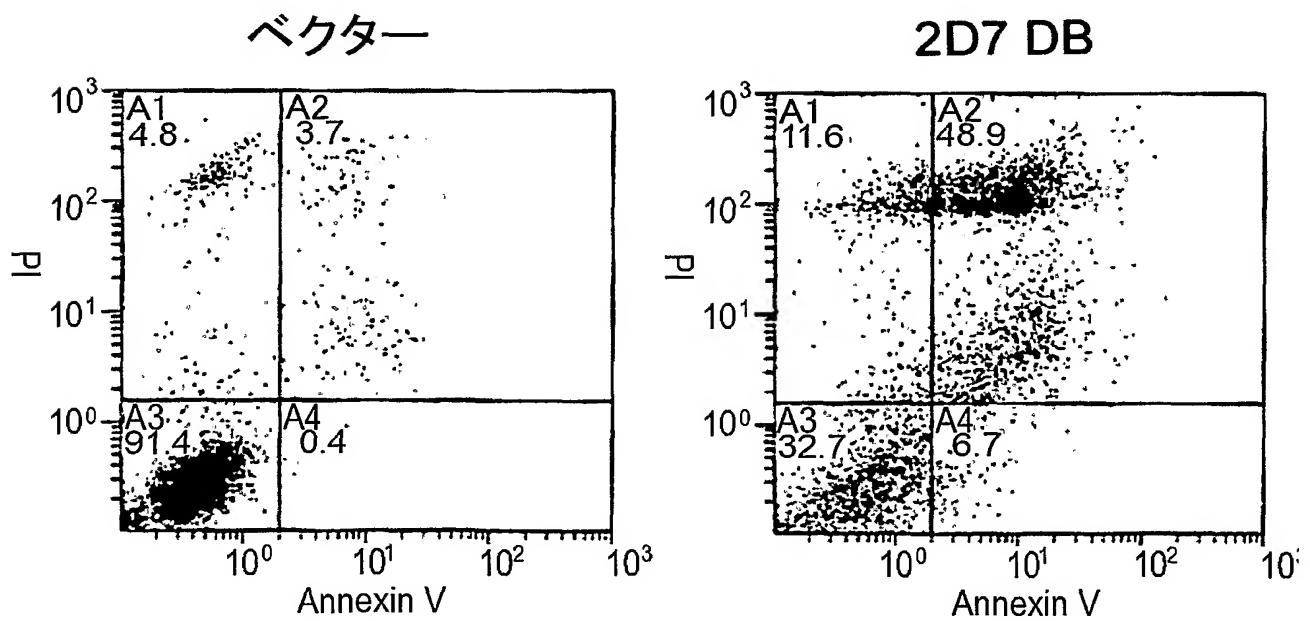
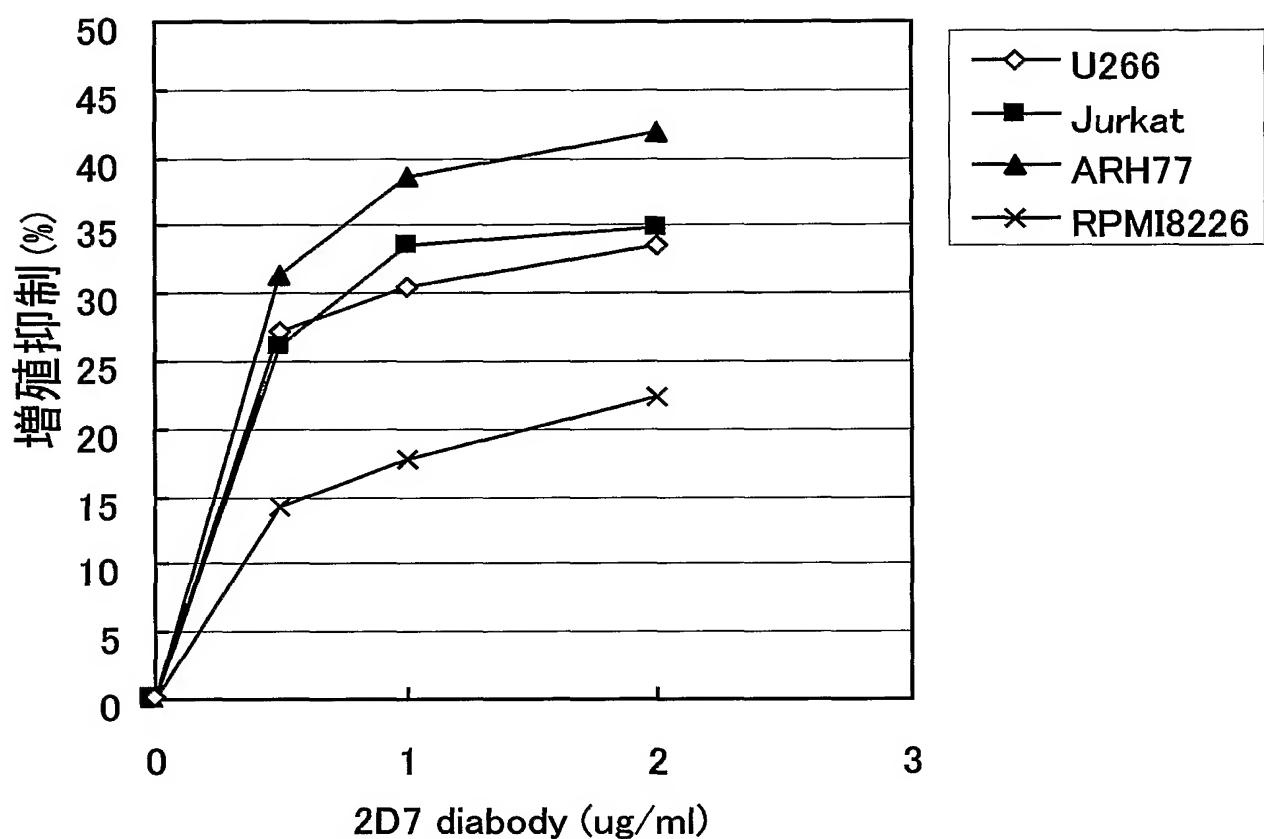


図 13 D



21 / 37

図14



22 / 37

図 15 A

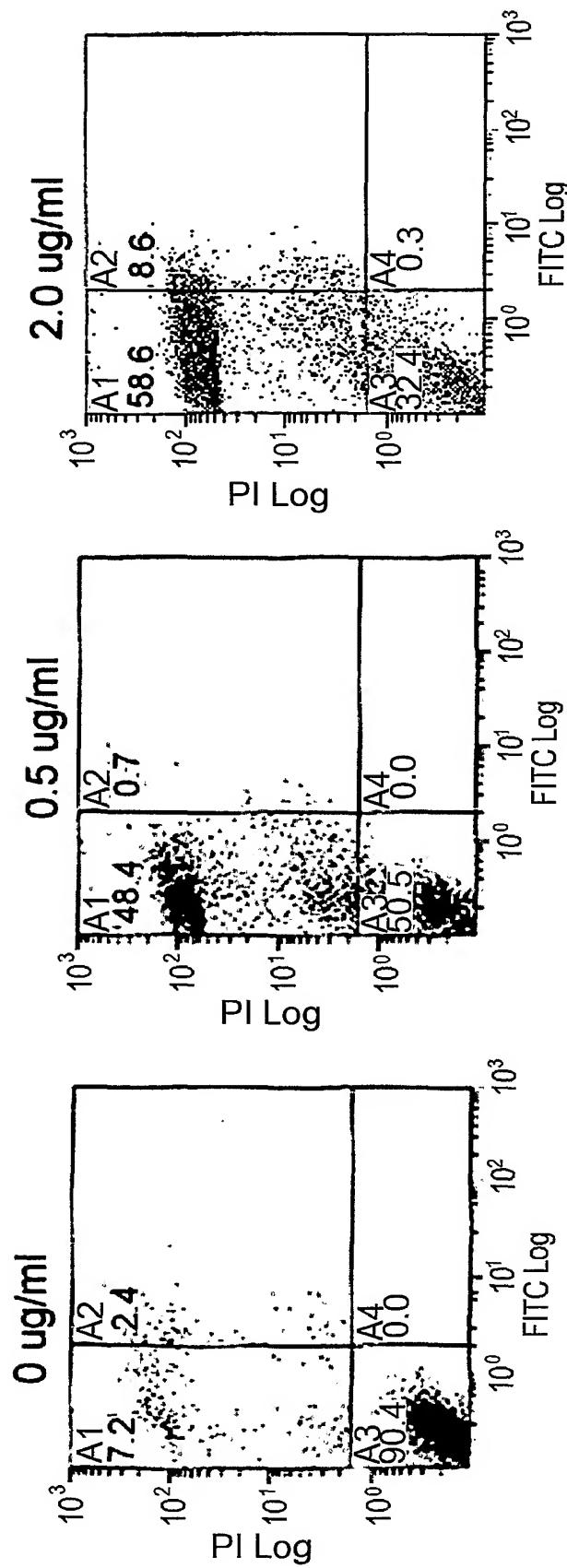
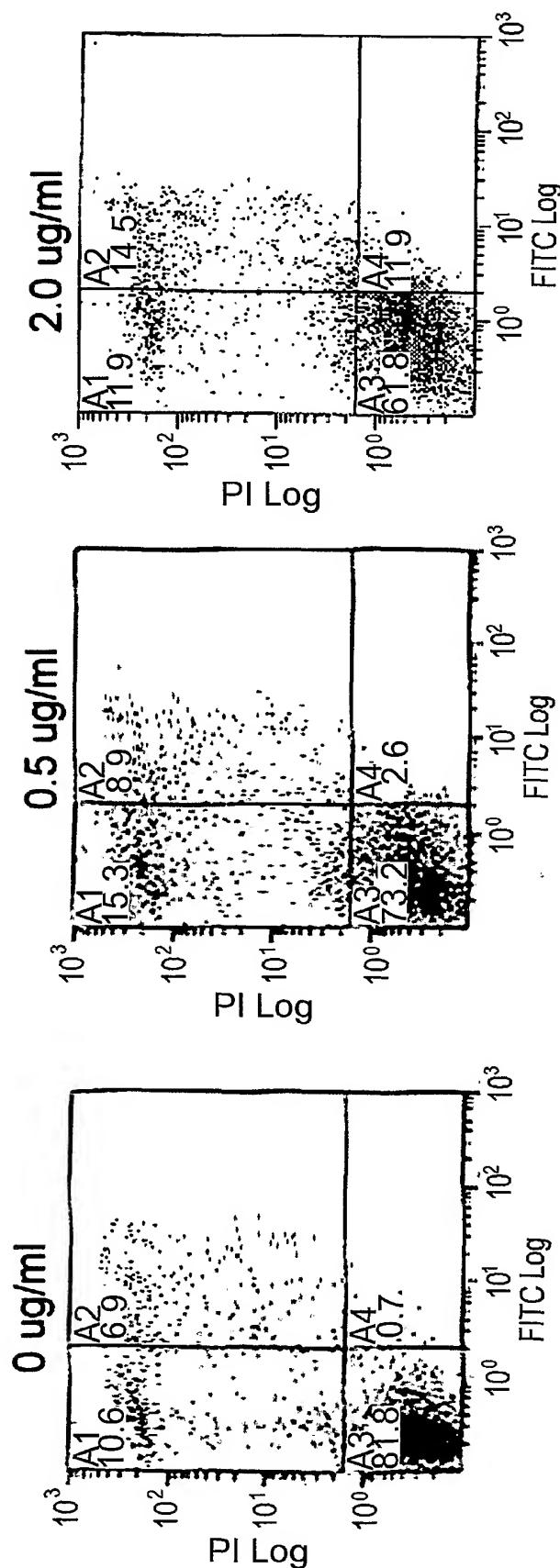


図 15 B



2 3 / 3 7

図 15 C

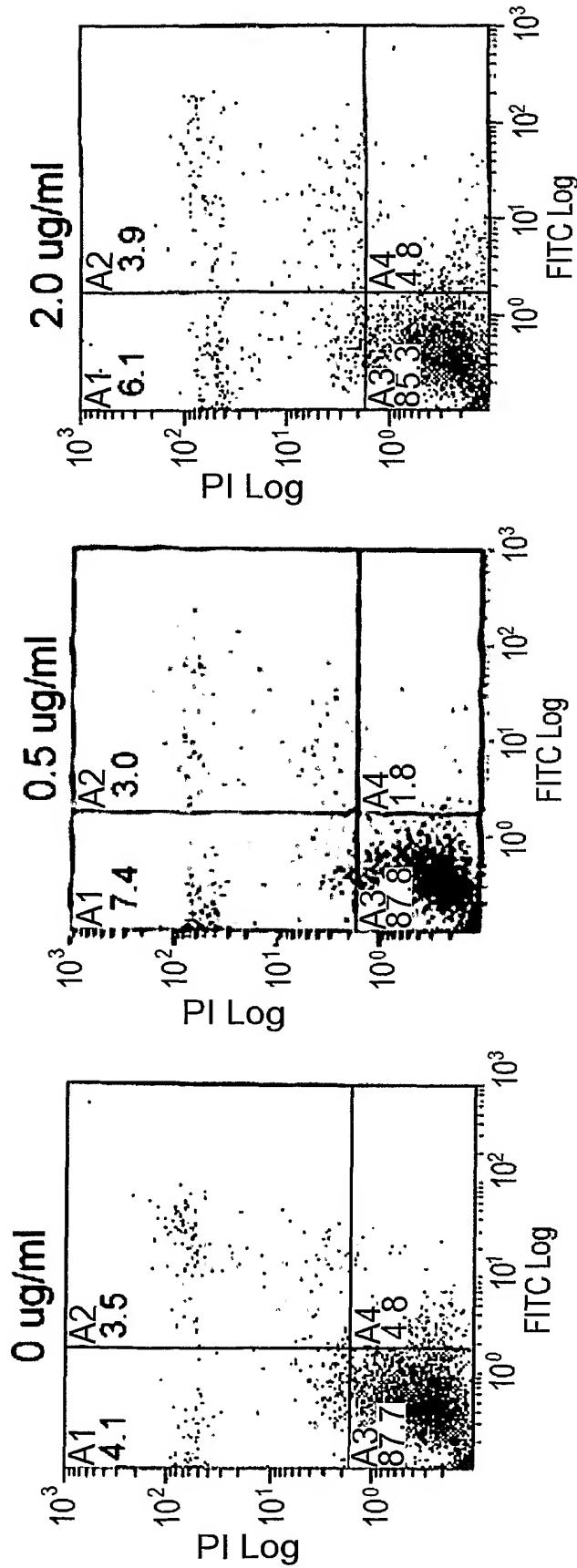
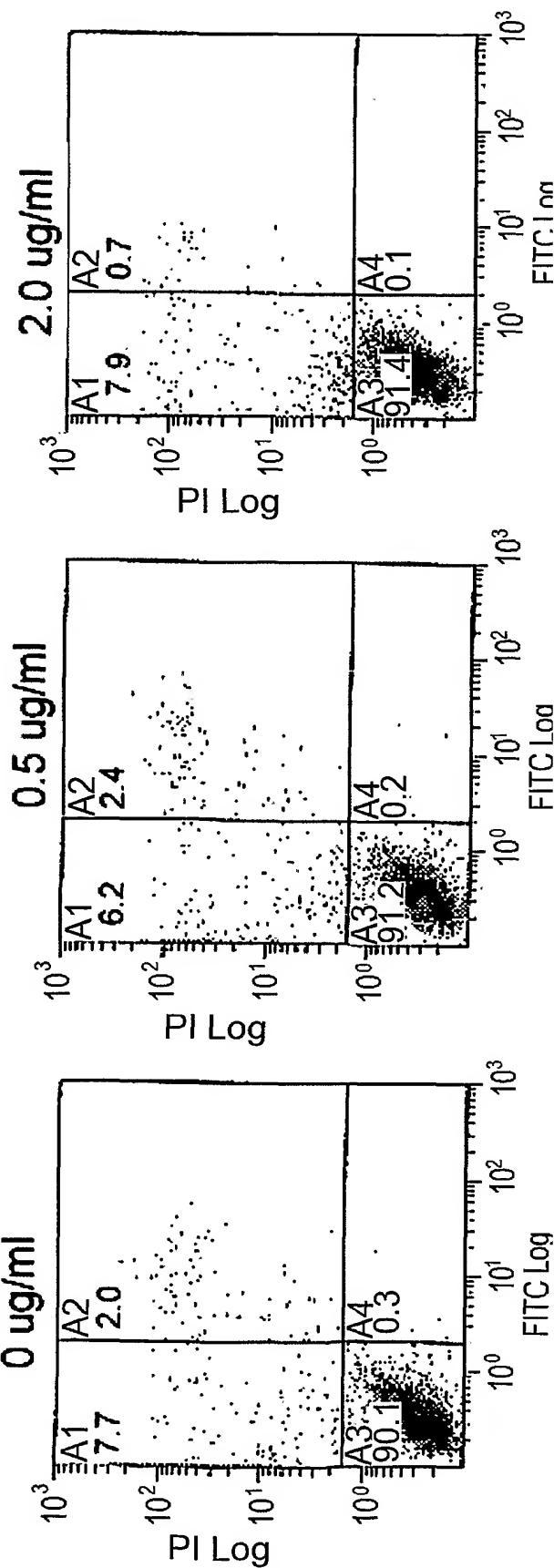


図 15 D



2 4 / 3 7

図 1 6 A

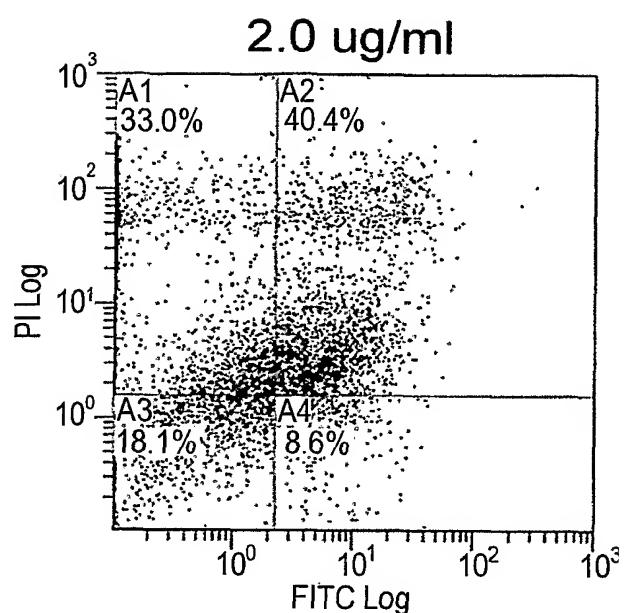
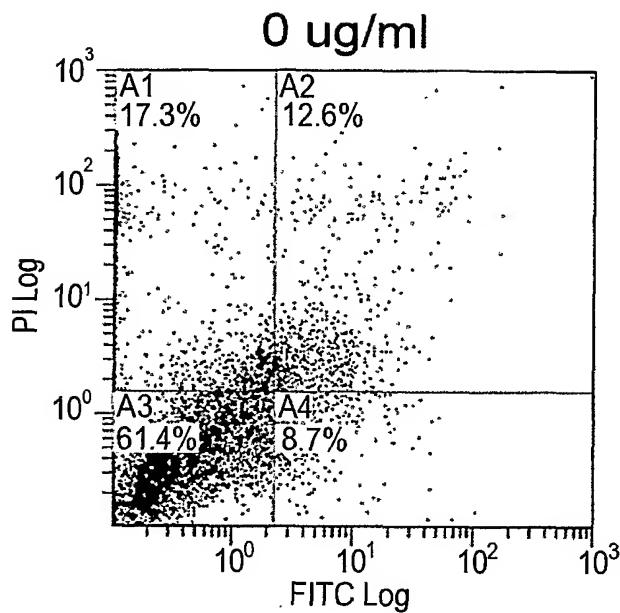
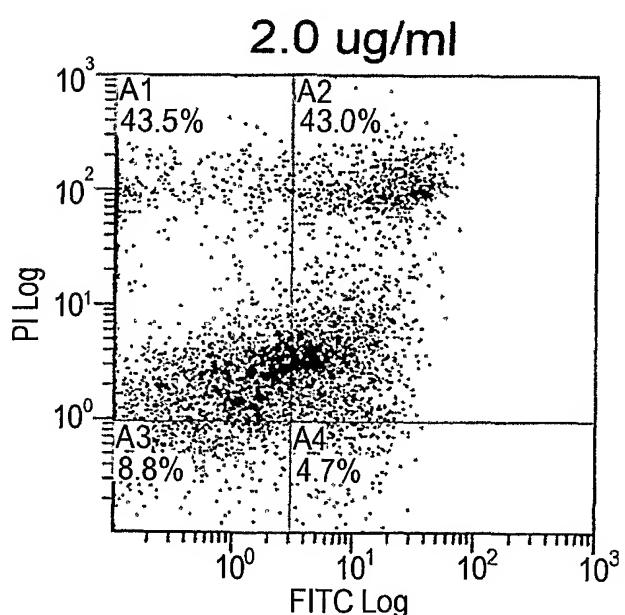
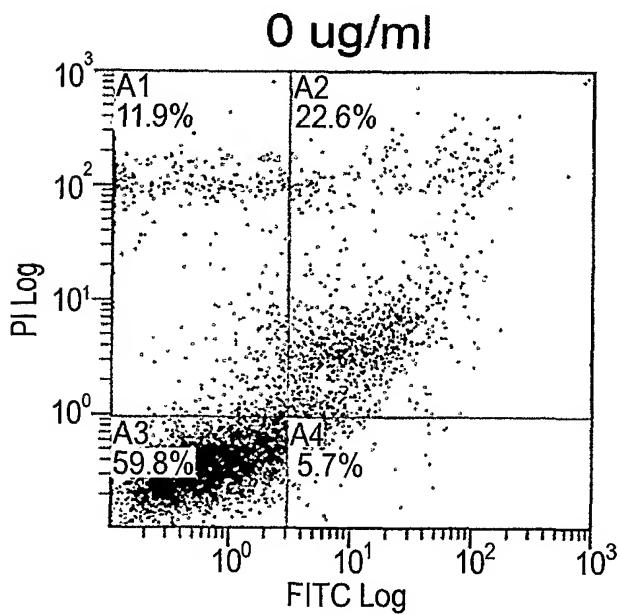
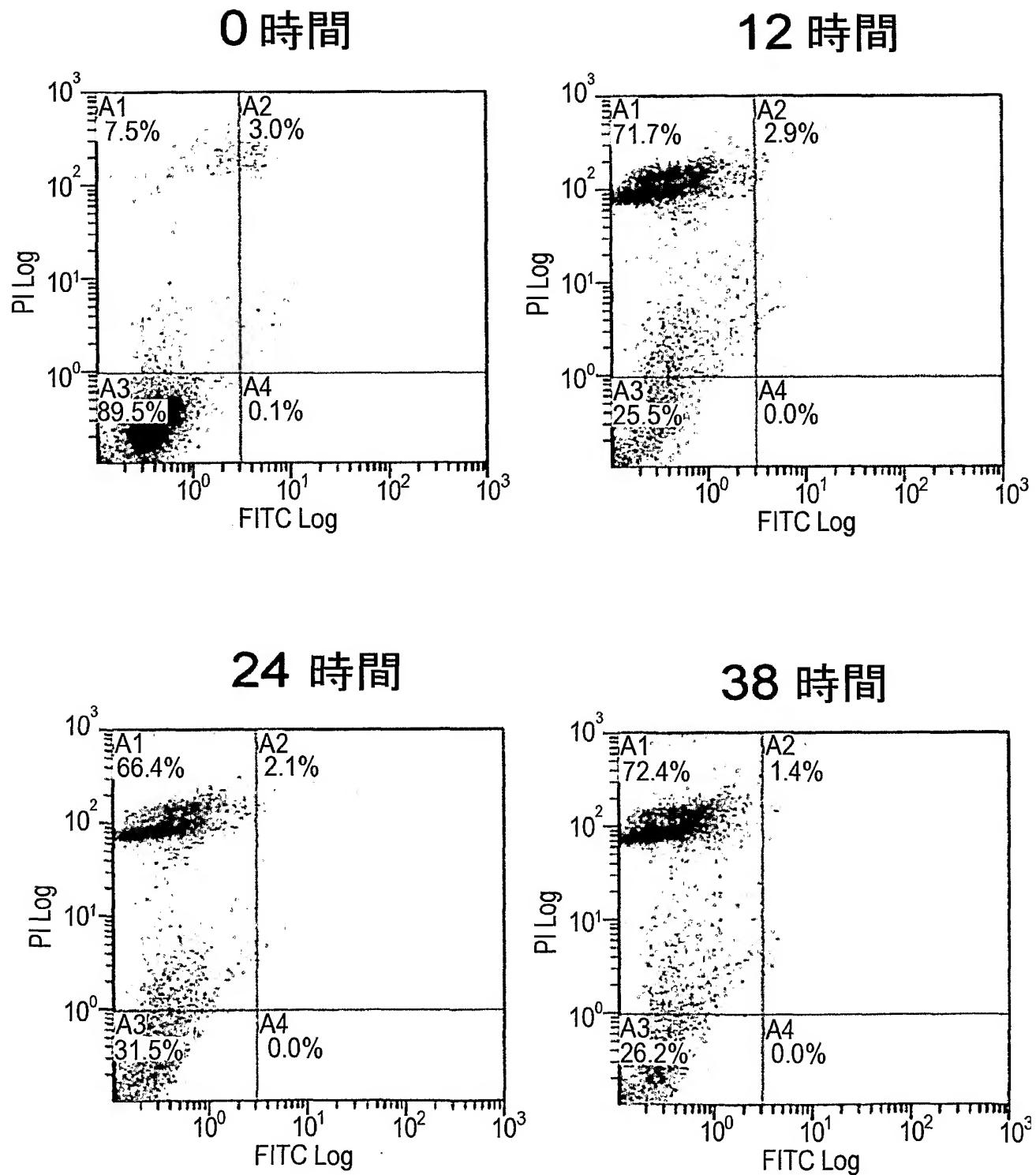


図 1 6 B



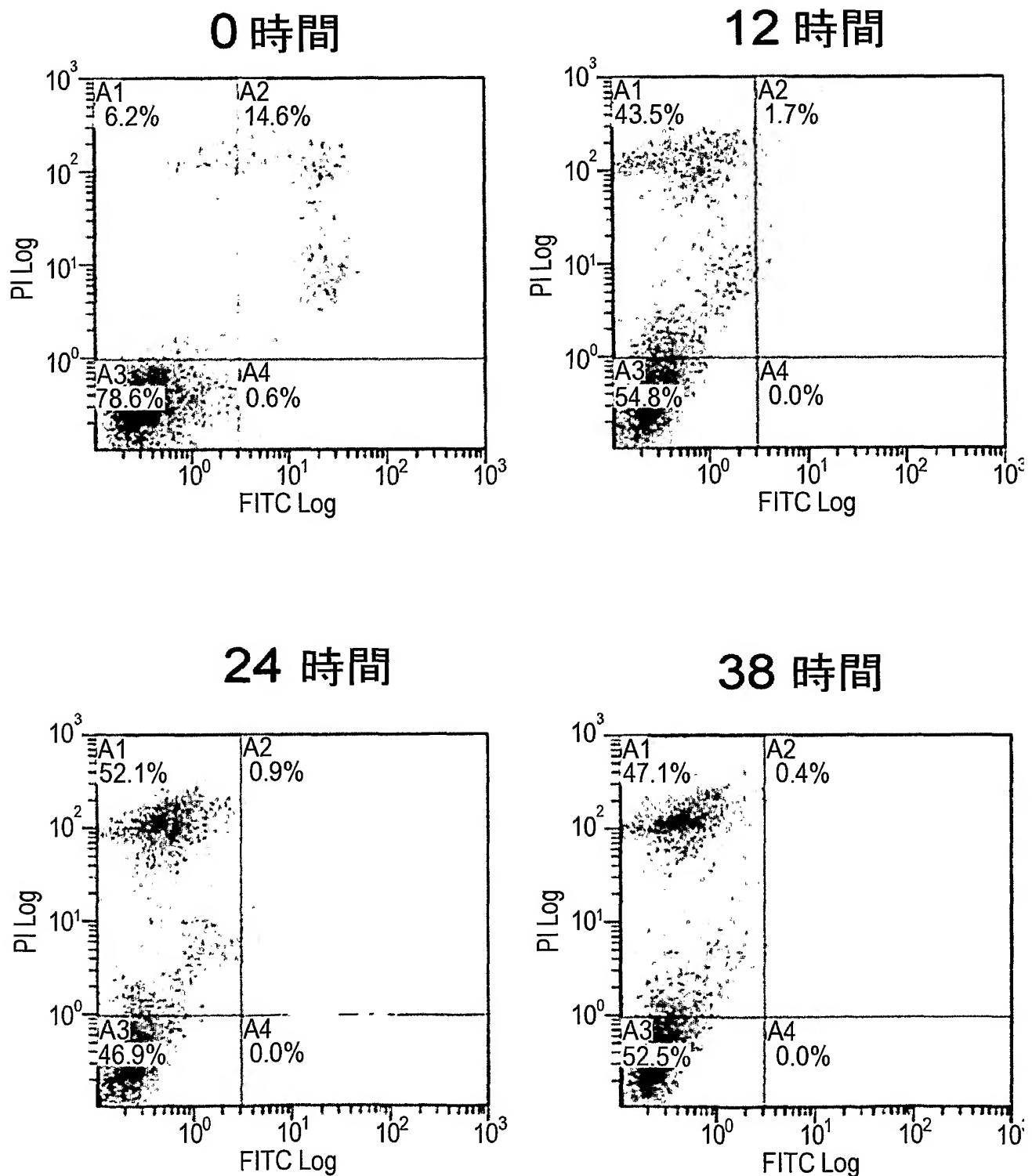
25 / 37

図 17 A



26 / 37

図 17 B



27 / 37

図 18 A

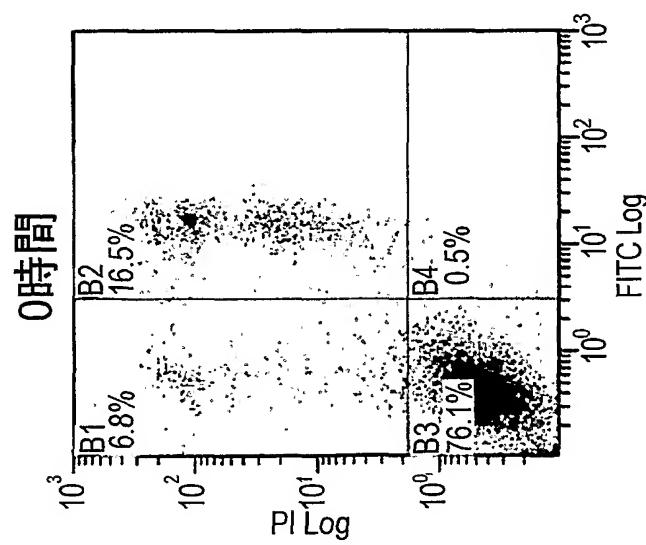
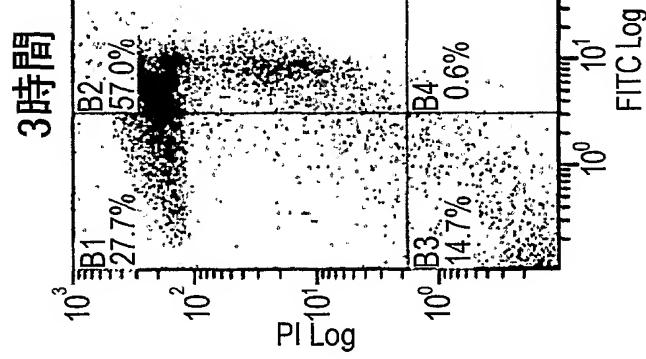
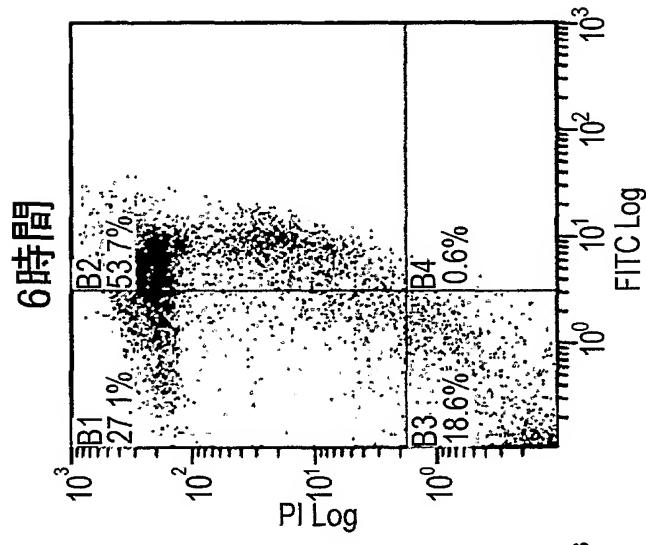
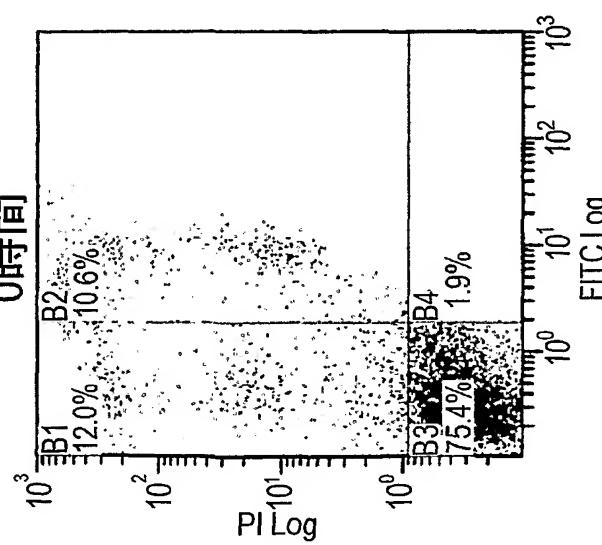
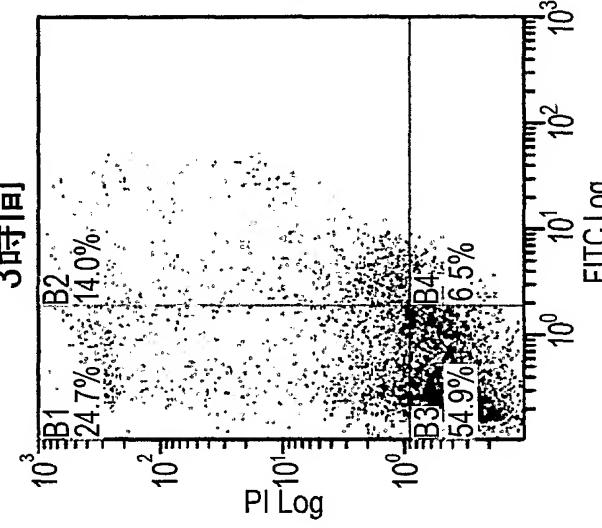
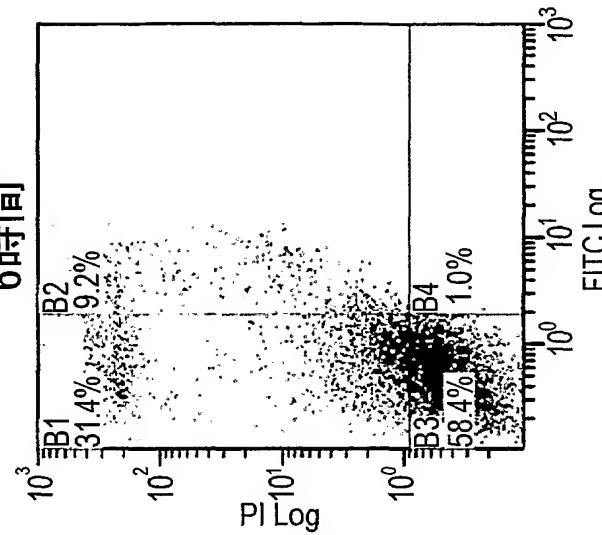
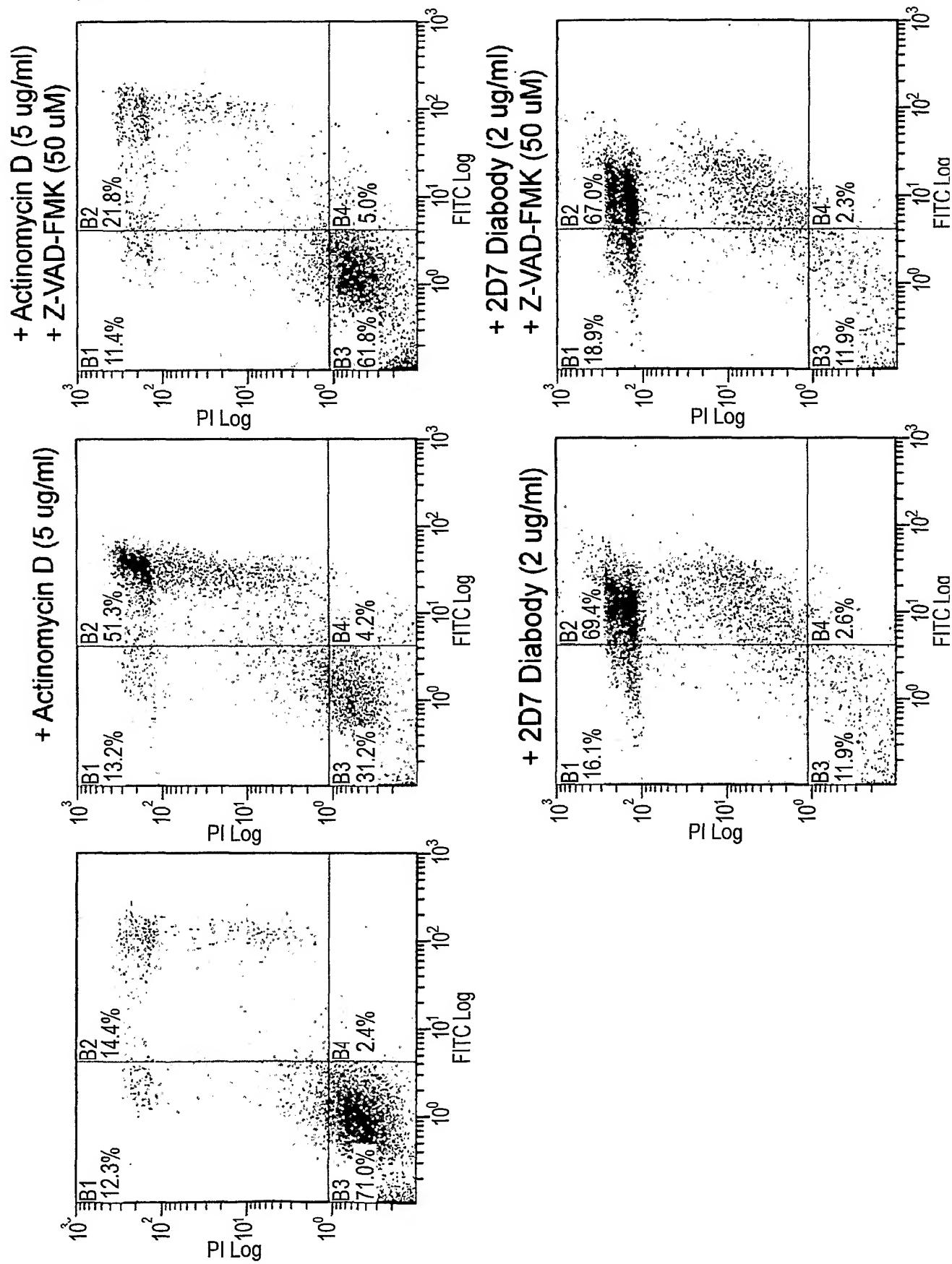


図 18 B



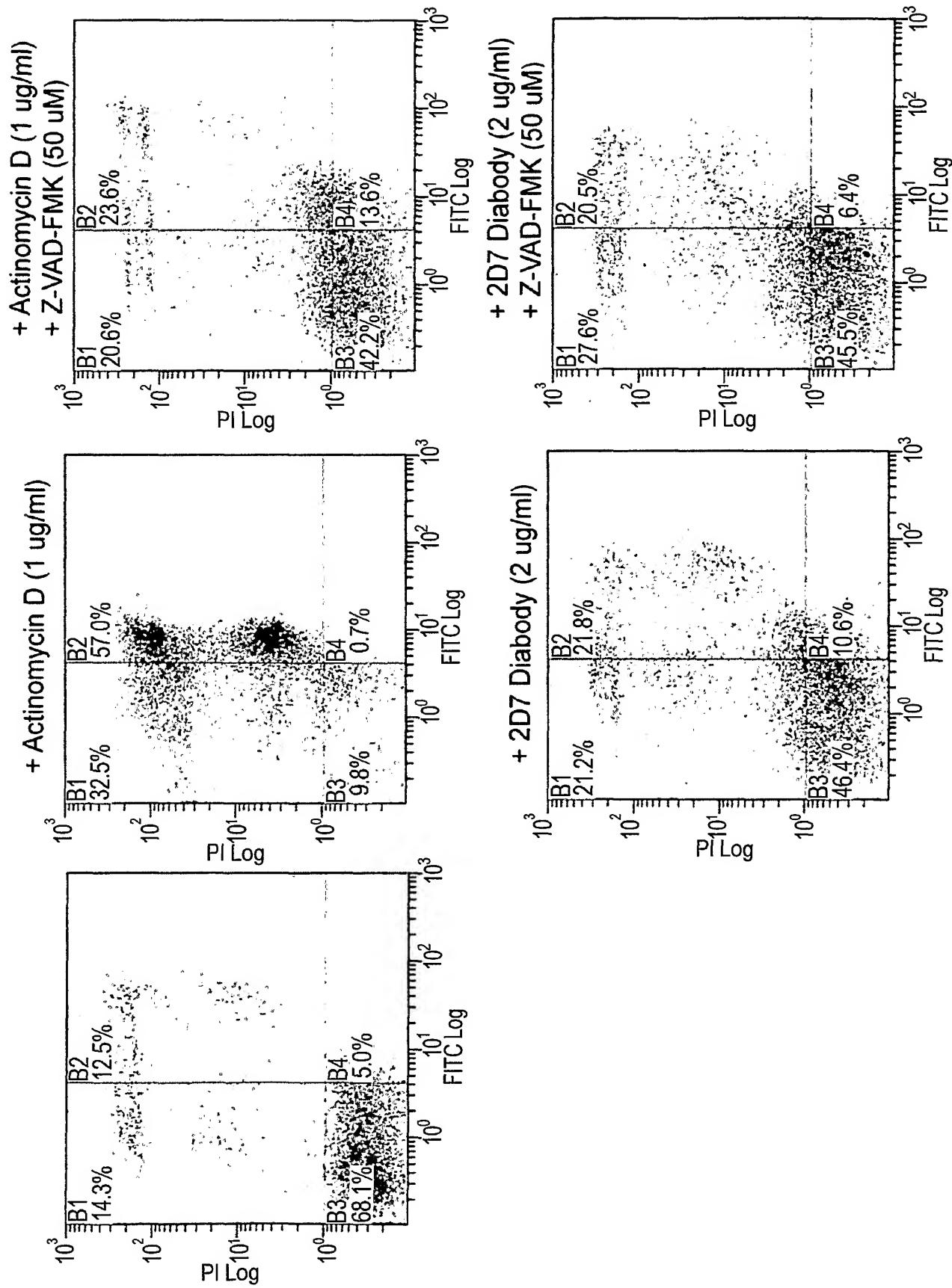
2 8 / 3 7

図 19



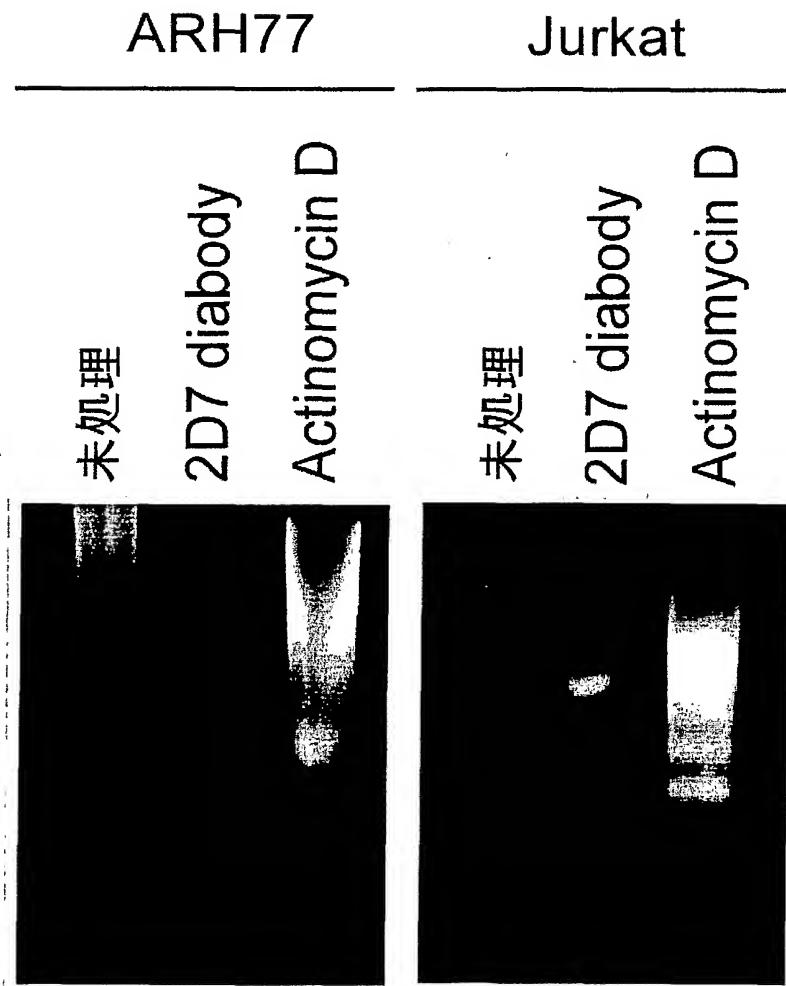
2 9 / 3 7

図 2 0



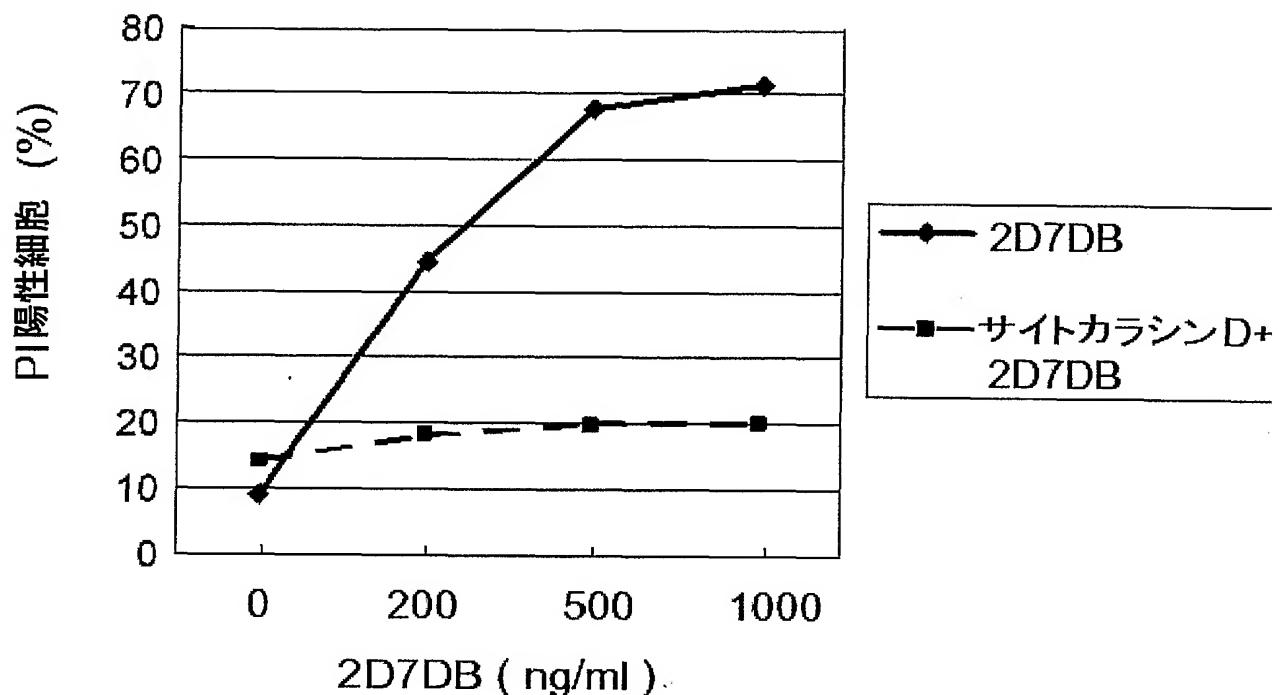
30 / 37

図 21



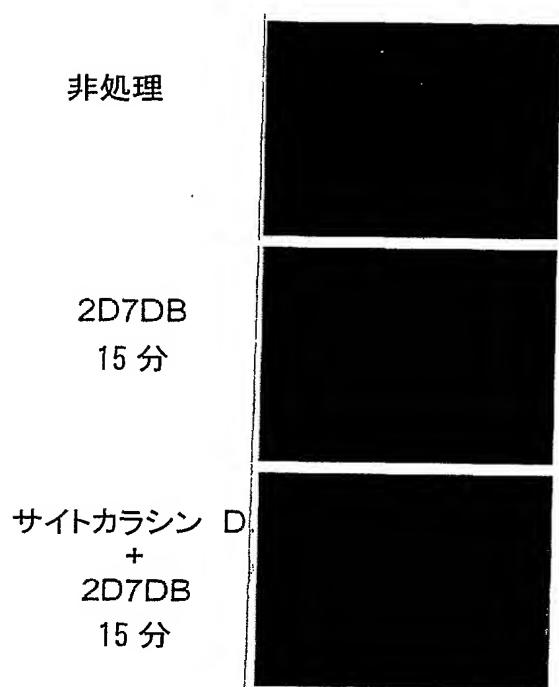
31 / 37

図 22



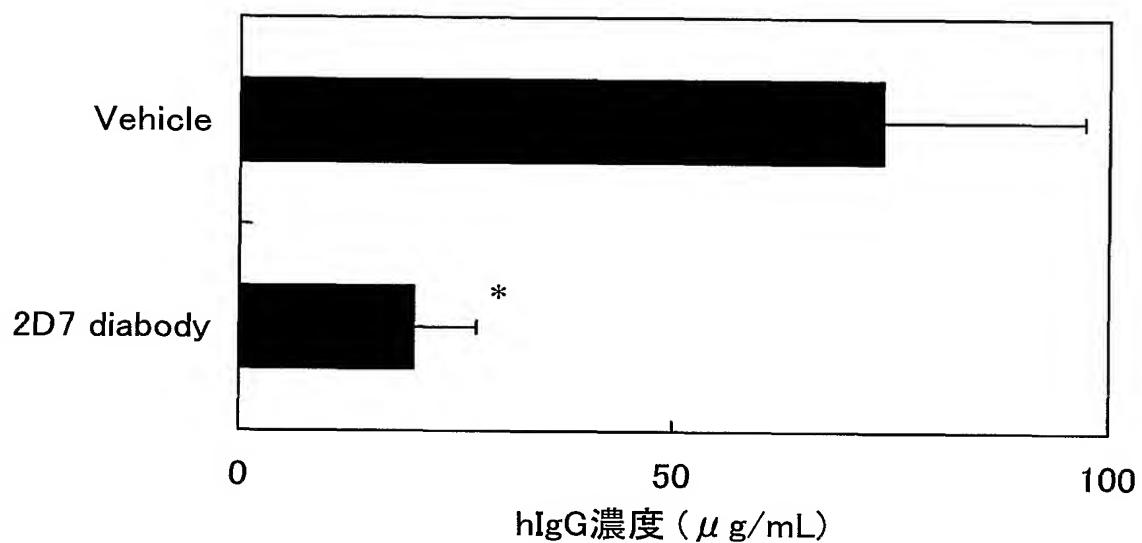
3 2 / 3 7

図 2 3



33 / 37

図 24



3 4 / 3 7

図 25

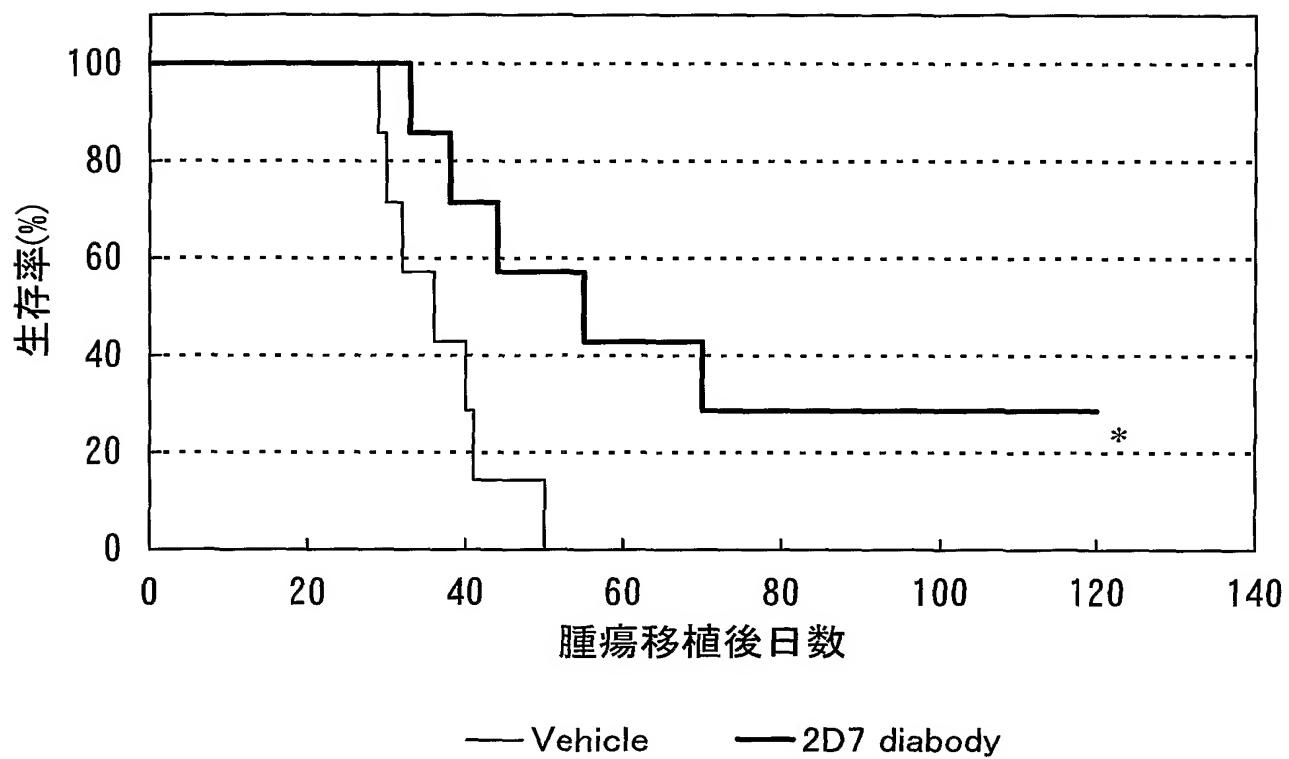


図 26 A

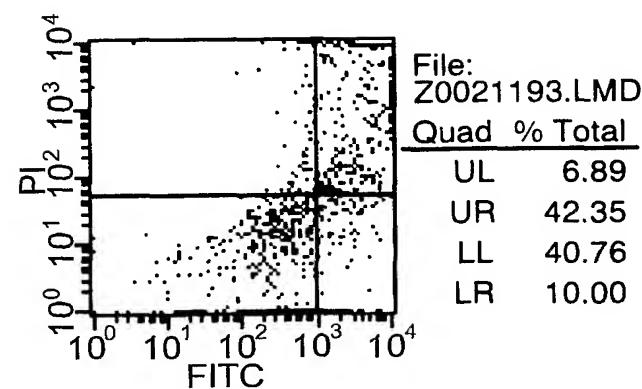
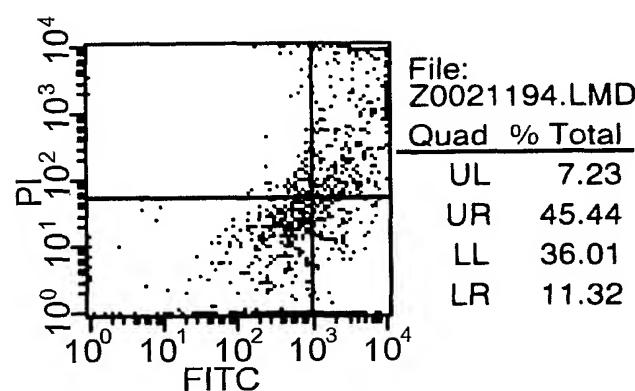
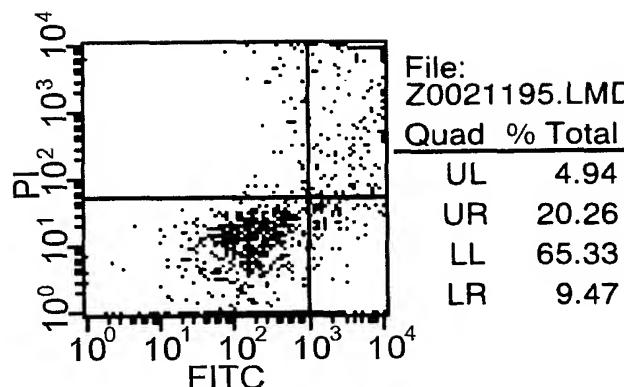


図 26 B

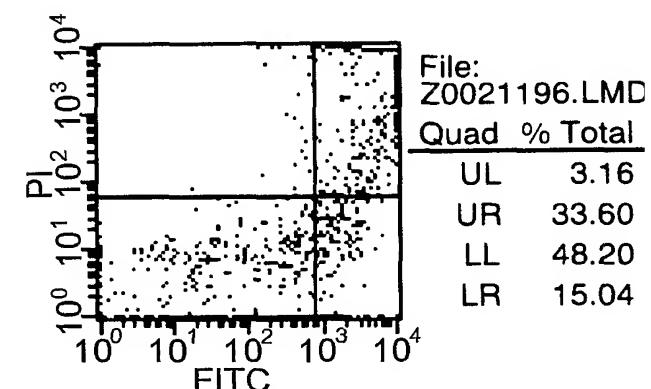
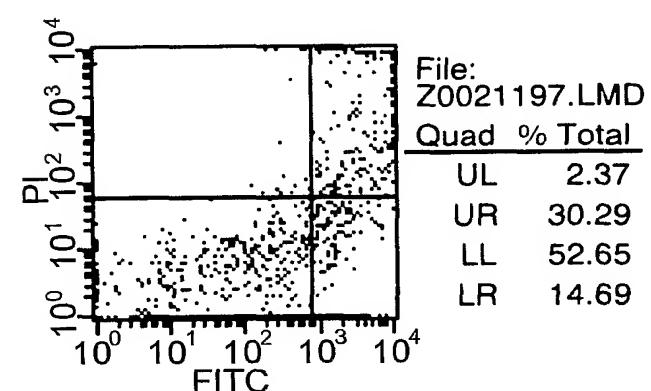
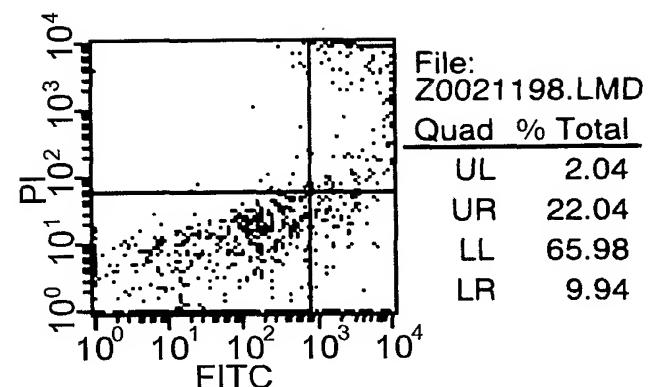
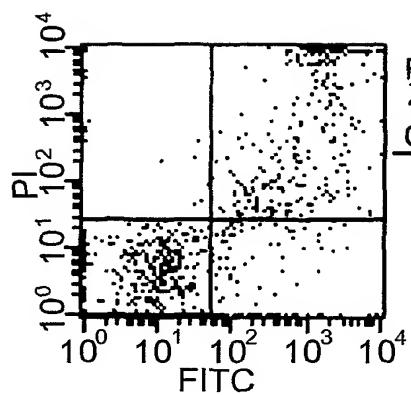
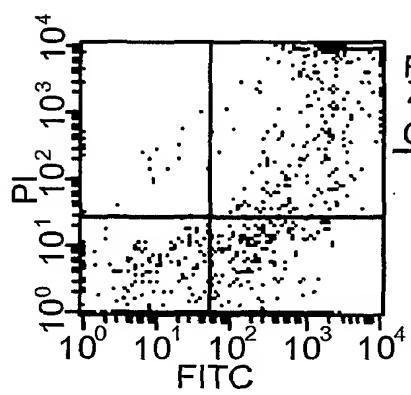


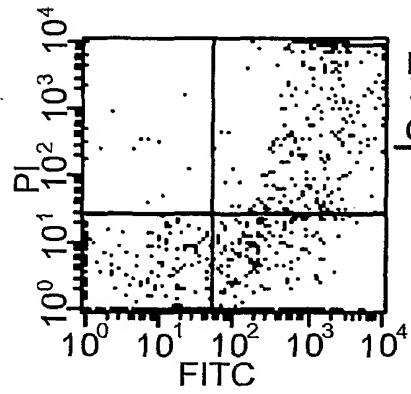
図 2 6 C



File: Z0021202.LMD	
Quad	% Total
UL	2.07
UR	31.24
LL	56.25
LR	10.44

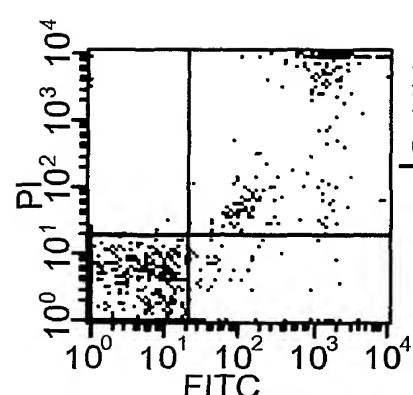


File: Z0021201.LMD	
Quad	% Total
UL	1.98
UR	37.69
LL	30.44
LR	29.89

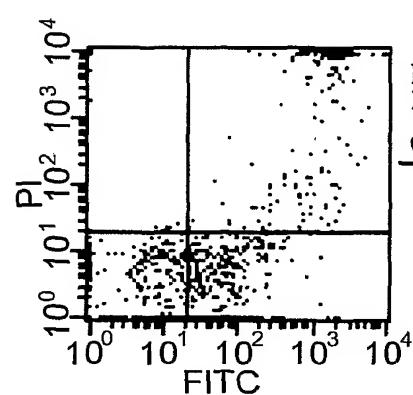


File: Z0021199.LMD	
Quad	% Total
UL	2.46
UR	40.37
LL	31.00
LR	26.17

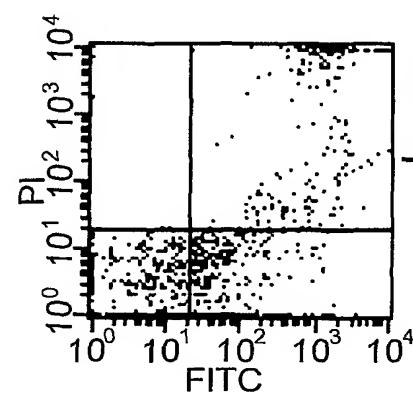
図 2 6 D



File: Z0021205.LMD	
Quad	% Total
UL	1.20
UR	28.74
LL	63.74
LR	6.32



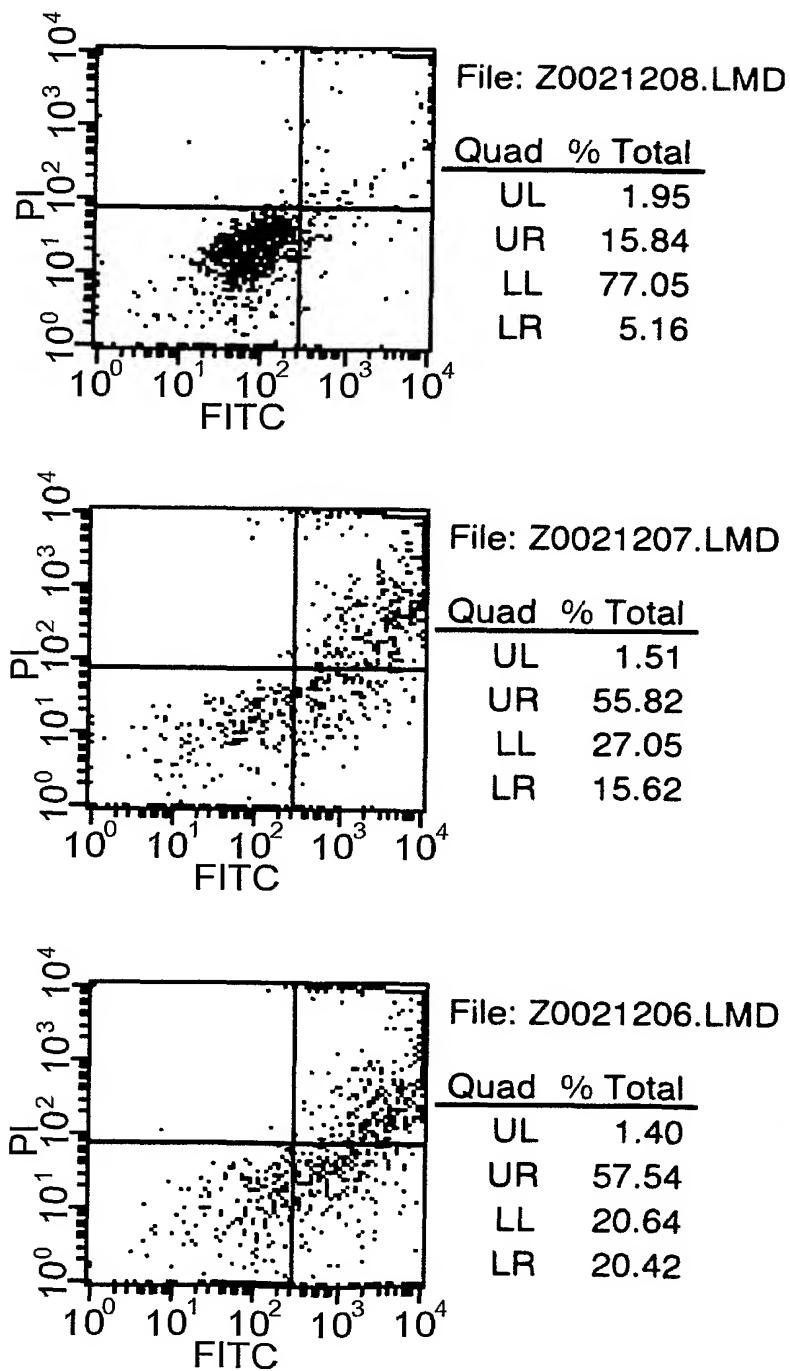
File: Z0021204.LMD	
Quad	% Total
UL	0.91
UR	22.71
LL	40.28
LR	36.10



File: Z0021203.LMD	
Quad	% Total
UL	0.93
UR	24.60
LL	42.03
LR	32.44

37 / 37

図26E



1 / 1 4

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

OZAKI Shuji

ABE Masahiro

<120> Inducer Of Cell Death

<130> C1-A0404P

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 547

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

tacgactcac tatagggcaa gcagtggtat caacgcagag tacgcgggaa atctatgatc 60

agtgtcctct ctacacagtc cctgacgaca ctgactccaa ccatgcgatg gagctggatc 120

tttctttcc tcctgtcaat aactgcaggt gtccattgcc aggtccagtt gcagcagtct 180

2 / 1 4

ggacctgagc tggtgaagcc tggggcttca gtgaagatgt ctgttaaggc ttctggctac 240
acttcacag actacttat acactgggtg aaacagaggc ctggacaggg acttgaatgg 300
attggatgga ttttcctgg agatgatact actgattaca atgagaagtt cagggcaag 360
accacactga ctgcagacaa atcctccagc acagcctaca tttgctcag cagcctgacc 420
tctgaggact ctgcgatgta tttctgtgta aggagtgacg actttgacta ctggggccag 480
ggcaccactc tcacagtctc ctcagccaaa acaacacccc catcagtcta tccactggcc 540
cctgctg 547

<210> 2

<211> 535

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

ctaatacgac tcactatagg gcaaggcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggactwatg 60

agaatagcag taatttagcta gggacccaaa ttcaaagaca aaatgcattt tcaagtgcag 120

atttcagct tcctgctaat cagtgcctca gtcatcatgt ccagaggaca aattgttctc 180

3 / 14

acccagtcgc cagcaatcat gtctgcatct ccaggggaga aggtcaccat aacctgcagt 240

gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg ttccagcaga agccagggcac ttttcccaa 300

ctctggattt atagcacatc caaccctggct tctggagtcc ctactcgctt cagtgccagt 360

ggatctggga cctcttactc tctcacaatc agccgaatgg aggctgaaga tgctgccact 420

tattactgcc agcaaaggac gagttatcca cccacgttcg gctcggggac aaagttggag 480

ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta tccatttcc caccatccag tgagc 535

<210> 3

<211> 789

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<220>

<221> CDS

<222> (14)..(775)

<223>

4 / 1 4

<400> 3

cctgaattcc acc atg cga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca 49

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser

1 5 10

ata act gca ggt gtc cat tgc cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct 97

Ile Thr Ala Gly Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro

15 20 25

gag ctg gtg aag cct ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct 145

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

30 35 40

ggc tac acc ttc aca gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct 193

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro

45 50 55 60

gga cag gga ctt gaa tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act 241

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr

65 70 75

act gat tac aat gag aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac 289

Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp

80 85 90

5 / 1 4

aaa tcc tcc agc aca gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag 337
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu

95 100 105

gac tct gcg atg tat ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg 385
Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp
110 115 120

ggc cag ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt agc caa 433
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gln
125 130 135 140

att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg tct gca tct cca ggg gag 481
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
145 150 155

aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tac atg cac 529
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
160 165 170

tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa ctc tgg att tat agc 577
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
175 180 185

aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc ttc agt ggc agt gga 625
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly

6 / 1 4

190 195 200

tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa gat 673

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp

205 210 215 220

gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt tat cca ccc acg ttc 721

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe

225 230 235

ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa gac tac aag gat gac gac gat 769

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

240 245 250

aag tga taagcggccg caat 789

Lys

<210> 4

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence

7 / 1 4

<400> 4

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met

100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr

8 / 1 4

130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile

145 150 155 160

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln

165 170 175

Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu

180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

195 200 205

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr

225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

245 250

<210> 5

<211> 29

9 / 1 4

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized adapter sequence

<400> 5

aattcccccagc acagtggttag ataagtaag

29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized adapter sequence

<400> 6

tcgacttact tatctaccac tgtgctggg

29

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

1 0 / 1 4

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

caggggccag tggatagact gatg

24

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

gctcactgga tggtggaag atg

23

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

1 1 / 1 4

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

cctgaattcc accatgcgat ggagctggat ctttc

35

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

aatttggcta ccgcctccac ctgaggagac tgtgagagtg gtgccct

47

<210> 11

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

1 2 / 1 4

<400> 11

tcctcaggtg gaggcggtag ccaaattgtt ctcacccagt cgccagc

47

<210> 12

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tcctttagt cttttatctc caactttgtc 60

cccgagcc

68

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Asp Tyr Phe Ile His

1 3 / 1 4

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 14

Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 15

Ser Asp Asp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 16

<211> 10

1 4 / 1 4

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 17

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 18

Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C07K16/46, A61P35/00, A61P37/02,
A61P43/00, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C07K16/46, A61P35/00, A61P37/02,
A61P43/00, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hudson P.J. et al., High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies, J.Immunol.Methods, 1999, Vol.231, pages 177 to 189	1-14
Y	Kortt A.A. et al., Dimeric and trimeric anti bodies: high avidity scFVs for cancer targeting, Biomol.Eng., 2001, Vol.18, pages 95 to 108	1-14
Y	Xiong D. et al., Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20 x anti-CD3 bispecific diabody, Cancer Lett., 2002, Vol.177, pages 29 to 39	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2004 (05.07.04)

Date of mailing of the international search report
20 July, 2004 (20.07.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005152

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATSUOKA S. et al., A novel type of cell death of lymphocytes induced by a monoclonal antibody without participation of complement, J.Exp.Med., 1995, Vol.181, pages 2007 to 2015	1-14
Y	Fayen J. et al., Negative signaling by anti-HLA class I antibodies is dependent upon two triggering events, Int.Immunol., 1998, Vol.10, pages 1347 to 1358	1-14
Y	Woodle E.S. et al., Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway, J.Immunol., 1997, Vol.158, pages 2156 to 2164	1-14
Y	Tahtis k. et al., Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3S193 diabody and F(ab') ⁽²⁾ , constructs in a breast carcinoma xenograft model, Clin.Cancer Res., 2001, Vol.7, pages 1061 to 1072	1-14
Y	Rossi E.A. et al., Development of new multivalent-bispecific agents for pretargeting tumor localization and therapy, Clin.Cancer Res., 2003, Vol.9, pages 3886S to 3896S	1-14
E, X	WO 04/033499 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 April, 2004 (22.04.04), Full text (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/09, C07K16/28, C07K16/46, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/09, C07K16/28, C07K16/46, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Hudson P. J. et al, High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies, J Immunol Methods, 1999, Vol. 231, p. 177-189	1-14
Y	Kortt A. A. et al, Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting, Biomol Eng, 2001, Vol. 18, p. 95-108	1-14
Y	Xiong D. et al, Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20 x anti-CD3 bispecific diabody, Cancer Lett, 2002, Vol. 177, p. 29-39	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.07.2004

国際調査報告の発送日

20.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎

4B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Matsuoka S. et al, A novel type of cell death of lymphocytes induced by a monoclonal antibody without participation of complement, J Exp Med, 1995, Vol. 181, p.2007-2015	1-14
Y	Fayen J. et al, Negative signaling by anti-HLA class I antibodies is dependent upon two triggering events, Int Immunol, 1998, Vol. 10, p.1347-1358	1-14
Y	Woodle E. S. et al, Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway, J Immunol, 1997, Vol. 158, p. 2156-2164	1-14
Y	Tahtis k. et al, Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3S193 diabody and F(ab') ₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model, Clin Cancer Res, 2001, Vol. 7, p. 1061-1072	1-14
Y	Rossi E. A. et al, Development of new multivalent-bispecific agents for pretargeting tumor localization and therapy, Clin Cancer Res, 2003, Vol. 9, p. 3886S-3896S	1-14
EX	WO 04/033499 A1 (中外製薬株式会社) 2004.04.22, 全文 (ファミリーなし)	1-14